



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO
POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENÉTICA

CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS DE cDNA PARA BÚSQUEDA DE GENES DE RESISTENCIA A SEQUÍA EN *Bouteloua gracilis*

MA. GUADALUPE VALADEZ BUSTOS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2015

La presente tesis, titulada: **CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS DE cDNA PARA BÚSQUEDA DE GENES DE RESISTENCIA A SEQUÍA EN *Bouteloua gracilis***, realizada por la alumna: **MA. GUADALUPE VALADEZ BUSTOS**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS

RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENETICA

CONSEJO PARTICULAR

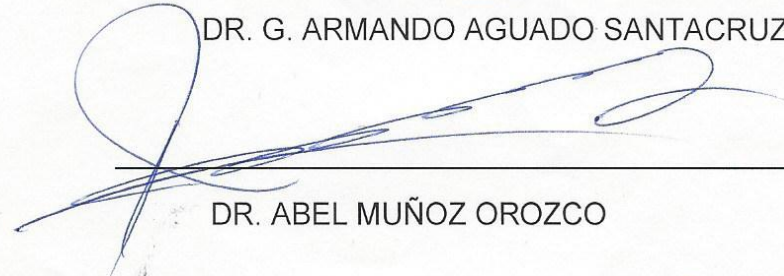
CONSEJERO


DR. AMALIO SANTACRUZ VARELA

DIRECTOR DE TESIS


DR. G. ARMANDO AGUADO SANTACRUZ


ASESOR


DR. ABEL MUÑOZ OROZCO

ASESORA


DRA. ALEJANDRINA ROBLEDO PAZ

ASESORA


DRA. HILDA V. SILVA ROJAS

ASESOR


DR. QUINTÍN RASCÓN CRUZ

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2015

CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS DE cDNA PARA BÚSQUEDA DE GENES DE RESISTENCIA A SEQUÍA EN *Bouteloua gracilis*

Ma. Guadalupe Valadez Bustos, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

RESUMEN

El pasto navajita (*Bouteloua gracilis*) [Willd. ex Kunth] Lag. ex Griffiths es una planta altamente tolerante a la sequía, y por tanto una fuente potencial de genes relacionados con estrés hídrico. A la fecha se tienen los primeros esquemas biotecnológicos en este pasto, siendo el desarrollo de los primeros cultivos celulares clorofílicos de *Bouteloua gracilis* dentro de la familia Poaceae, un parteaguas para el estudio de los mecanismos que le permiten a esta gramínea tolerar las severas condiciones ambientales que prevalecen en su área de distribución. El presente estudio tuvo como finalidad evaluar algunos mecanismos fisiológicos y moleculares que ocurren en las células clorofílicas de *B. gracilis* cuando se encuentran en estrés osmótico inducido mediante polietilenglicol 8000 (PEG) al 14 y 21%. Para el estudio de los mecanismos celulares se cuantificaron los osmolitos prolina, glicina betaína (GB), sacarosa, fructuosa, glucosa, trehalosa y almidón, además de los niveles de clorofila, peso fresco y seco de las células, potencial osmótico, hídrico y de turgencia. Para la determinación de GB se realizó una modificación de una técnica espectrofotométrica para aplicarla en cultivos celulares con altos contenidos de GB. Posteriormente, se construyeron bibliotecas de cDNA a partir de células clorofílicas sometidas a estrés osmótico, con la finalidad de realizar una búsqueda de genes relacionados con la tolerancia al estrés hídrico. Con la modificación de la técnica para cuantificación de GB se logró obtener un método simple, rápido, confiable y barato para la determinación de este osmolito en muestras de plantas y cultivos celulares en suspensión. Los resultados obtenidos en las cinéticas de crecimiento mostraron que el tratamiento con 21% de PEG produjo los niveles máximos de osmolitos como prolina, GB, trehalosa, glucosa, fructuosa y también de clorofila. A partir de bibliotecas de cDNA provenientes de células clorofílicas del día 6 en tratamiento con PEG, se logró aislar 335 clonas putativas positivas, encontrándose en la clona 13, que fue hibridada con la sonda superóxido dismutasa (SOD), mostró una similitud del 98% con el gen que codifica para la proteína *WOX5A* que ha sido identificada en la diferenciación celular y el metabolismo secundario en *Zea mays*, 98% de similitud con acuaporinas PIP (*HvPIP2*) de *Hordeum vulgare* y 75% con *IncRNA* de respuesta a estrés hídrico en *Zea mays*.

Palabras clave: Cultivos celulares, estrés hídrico, osmolitos, gramíneas.

**CONSTRUCTION OF cDNA LIBRARIES FOR SEARCHING GENES OF DROUGHT
RESISTANCE IN *Bouteloua gracilis***

Ma. Guadalupe Valadez Bustos, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2015

ABSTRACT

Gramma grass (*Bouteloua gracilis*) [Willd. ex Kunth] Lag. ex Griffiths is a plant highly drought tolerant plant, and therefore, a potential source of genes related to water stress. To date, the first biotechnological schemes have been developed to this grass, with the development of the first chlorophyllic cell cultures of *Bouteloua gracilis* within the Poaceae family, as a breakthrough for the study of mechanisms that allow this grass tolerate the severe environmental conditions prevailing in its distribution area. This study aimed to evaluate some physiological and molecular mechanisms that occur in the chlorophyllic cells of *B. gracilis* under osmotic stress as induced by polyethylene glycol 8000 (PEG) 14 and 21%. For the study of cellular mechanisms osmolytes proline, glycine betaine (GB), sucrose, fructose, glucose, trehalose and starch were quantified, as well as chlorophyll levels, fresh and dry weight of cells, osmotic, water and pressure potentials. For determination of GB a modification of a spectrophotometric technique was performed for applying it in cell cultures with high contents of GB. Subsequently, cDNA libraries were constructed from chlorophyllic cells subjected to osmotic stress, in order to conduct a search of genes related to water stress tolerance. The modification of the technique for quantifying GB resulted in a simple, fast, reliable and inexpensive method to determine this osmolyte in plant samples and cell cultures in suspension. Results obtained from growth kinetics showed that treatment with 21% PEG produced the highest levels of such osmolytes as proline, GB, trehalose, glucose, fructose and chlorophyll. It was possible to isolate 335 positive putative clones through cDNA libraries from chlorophyllic cells at the sixth day under the PEG treatment. Clone 13, which was hybridized with the superoxide dismutase (SOD) probe, showed a similarity of 98% with the gene encoding *WOX5A* protein, identified in cell differentiation and secondary metabolism in *Zea mays*, 98% similarity with PIP aquaporins (*HvPIP2*) of *Hordeum vulgare* and 75% similarity with *IncRNA* related to water stress response in *Zea mays*.

Key words: Cell cultures, water stress, osmolytes, grasses.

AGRADECIMIENTOS

A Dios

Por siempre acompañarme e iluminar mi camino para lograr esta meta tan importante en mi vida.

Al Colegio de Postgraduados (COLPOS), Al Instituto Nacional de Investigaciones, Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-Irapuato), A la Universidad Autónoma de Chihuahua (UACH)

Por permitirme realizar mis estudios y mi proyecto de investigación en sus instalaciones.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)

Por el apoyo económico para poder realizar esta investigación

Al Dr. Amalio Santacruz Varela

y al Dr. Armando Aguado Santacruz

Por las asesorías brindadas durante todo el desarrollo del proyecto de investigación, su confianza, su tiempo y su dedicación.

A mis asesores: Dra. Alejandrina Robledo Paz, Dra. Hilda Silva Rojas, Dr. Abel Muñoz

Orozco, Dr. Quintín Rascón Cruz

Por sus aportaciones para el enriquecimiento de mi investigación, por su apoyo, su tiempo y su confianza durante todo el transcurso de mis estudios.

A mi familia, profesores, amigos, y a todas aquellas personas que en cierto momento estuvieron apoyándome durante todos estos años de mi doctorado. He sido muy afortunada porque hasta el día de hoy nunca me he sentido sola, "muchas gracias".

DEDICATORIAS

A:

Dios:

Por cuidarme y protegerme.

Mis padres:

“Clemen y José”

Por ser mis grandes ejemplos de vida, y enseñarme los valores que me han servido para lograr superarme. Gracias por darme la vida, amor, estudios, compañía, hermanos, libertad y confianza. Gracias a ustedes, orgullosamente hoy soy lo que soy.

Mis hermanos:

Bernardo, Oscar y Nancy

Por estar siempre conmigo en los momentos más valiosos y difíciles de mi vida, yo se que siempre contaré con ustedes y que ustedes contarán conmigo incondicionalmente.

Erasmus:

El mejor compañero de vida que pude elegir. Que a pesar de tener que ir a diferentes lados a realizar mi investigación, siempre tuve su apoyo, comprensión, paciencia, ayuda, entusiasmo y su gran amor para que yo pudiera realizar esta meta personal tan importante en mi vida.

Una dedicación muy especial a una hermosa princesita que le dio luz a mi vida, gracias por llegar a nuestras vidas, eres una gran bendición:

“Mi adorada Emily”

CONTENIDO

Página

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL -----	1
OBJETIVOS -----	9
HIPÓTESIS -----	10
BIBLIOGRAFÍA -----	10
CAPÍTULO II. MÉTODO CONFIABLE PARA LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE GLICINA BETAÍNA EN CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN -----	19
RESUMEN -----	19
SUMMARY -----	20
INTRODUCTION-----	21
MATERIALS AND METHODS -----	24
RESULTS AND DISCUSSION -----	27
CONCLUSIONS -----	33
REFERENCES-----	33
CAPÍTULO III. ACUMULACIÓN DE SOLUTOS COMPATIBLES Y ADAPTACIÓN AL ESTRÉS OSMÓTICO DE CÉLULAS CLOROFILICAS DE <i>Bouteloua gracilis</i> -----	38
RESUMEN -----	38
SUMMARY -----	39
INTRODUCCIÓN -----	40
MATERIALES Y MÉTODOS -----	42
RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	45
CONCLUSIONES -----	55
REFERENCIAS -----	56
CAPÍTULO IV. CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS DE cDNA PARA BÚSQUEDA DE GENES DE RESISTENCIA A SEQUÍA EN <i>Bouteloua gracilis</i> -----	59
RESUMEN -----	59
SUMMARY -----	60

INTRODUCCIÓN -----	61
MATERIALES Y MÉTODOS -----	63
RESULTADOS Y DISCUSIÓN -----	67
CONCLUSIONES -----	85
REFERENCIAS -----	85

LISTA DE FIGURAS

Página

CAPÍTULO II

- Figura 1.** Glycine betaine crystals and their sedimentation. A) Sedimentation of glycine betaine in chlorophyllic cell growth cultures treated with 0, 14 or 21% PEG. B) Glycine betaine crystals observed at 40x. C) Glycine betaine crystals observed at 50x.....27
- Figura 2.** Evaluation of the optimal wavelength for glycine betaine determination within the range 300 to 600 nm. Readings of the 0, 14, and 21% PEG treatments 2.5 h after dissolving the crystals in 1,2-dichloroethane (A). Three-point reading of the calibration curve and the control treatment 2.5 h after dissolving the crystals (B).....29
- Figura 3.** Evaluation of the optimal wavelength for glycine betaine determination within the range 280 to 365 nm.....29
- Figura 4.** Evaluation of optimal reading time for samples of glycine betaine derived from *B. gracilis* chlorophyllic cells. Three-point reading of the calibration curve and the control treatment 6 h after dissolving the crystals in 1,2-dichloroethane (A). Readings taken after 12 h of the dissolution step (B).....30
- Figura 5.** Readings at 290 nm wavelength and different times after glycine betaine crystals dissolution in 1,2-dichloroethane.....31
- Figura 6.** Glycine betaine calibration curve obtained after optimization of wavelength and reading time after dissolution of glycine betaine crystals in 1,2-dichloroethane.....32
- Figura 7.** Concentration of glycine betaine obtained after averaging the results of the four cell growth kinetics assessments performed for all osmotic treatments.....32

CAPÍTULO III

- Figura 1.** Peso fresco y seco de células clorofílicas de *B. gracilis* bajo tratamientos de estrés osmótico. Los valores son la media de 10 repeticiones de 4 experimentos independientes. Las barras representan \pm el error estándar.....47

- Figura 2.** Potencial hídrico, osmótico y de turgencia de las células clorofílicas de *B. gracilis* en los tratamientos de estrés osmótico. Los valores son la media de 10 repeticiones de 4 experimentos independientes. Las barras representan \pm el error estándar.....49
- Figura 3.** Contenido de clorofila total en células clorofílicas de *B. gracilis* en los tratamientos de estrés osmótico. Los valores son la media de 10 repeticiones de 4 experimentos independientes. Las barras representan \pm el error estándar.....50
- Figura 4.** Contenido de prolina en células clorofílicas de *B. gracilis* crecidas en condiciones de estrés osmótico. Los valores son la media de 10 repeticiones de 4 experimentos independientes. Las barras representan \pm el error estándar.....51
- Figura 5.** Contenido de glicina betaína en células clorofílicas de *B. gracilis* crecidas en condiciones de estrés osmótico. Los valores son la media de 10 repeticiones de 4 experimentos independientes. Las barras representan \pm el error estándar.....52
- Figura 6.** Contenido de sacarosa, fructuosa y glucosa en células clorofílicas de *B. gracilis* crecidas en condiciones de estrés osmótico. Los valores son la media de 10 repeticiones de 4 experimentos independientes. Las barras representan \pm el error estándar.....53
- Figura 7.** Contenido de almidón en células clorofílicas de *B. gracilis* crecidas en condiciones de estrés osmótico. Los valores son la media de 10 repeticiones de 4 experimentos independientes. Las barras representan \pm el error estándar.....54
- Figura 8.** Contenido de trehalosa en las células clorofílicas de *B. gracilis* crecidas en condiciones de estrés osmótico. Los valores son la media de 10 repeticiones de 4 experimentos independientes. Las barras representan \pm el error estándar.....55

CAPÍTULO IV

- Figura 1.** Extracción de RNA en plantas completas y células clorofílicas del pasto *B. gracilis* bajo tratamientos de estrés osmótico. Carril 1: Células con 21% PEG; Carril 2: Células con 14% PEG; Carril 3,4 y 5: Plantas de *B. gracilis* cultivadas bajo invernadero.....67
- Figura 2.** Colonias de *Escherichia coli* conteniendo las bibliotecas de cDNA de células clorofílicas de *B. gracilis* bajo tratamientos de estrés osmótico (14 y 21% PEG).....69

- Figura 3.** Hibridación de colonias en placa de las bibliotecas de cDNA de células clorofílicas de *B. gracilis* bajo tratamientos de estrés osmótico (14 y 21% PEG).....69
- Figura 4.** Clonas putativas positivas provenientes de bibliotecas de cDNA de células clorofílicas de *B. gracilis* bajo tratamientos de estrés osmótico (14 y 21% PEG).....70
- Figura 5.** Extracción de ADN plasmídico de algunas clonas putativas positivas provenientes de bibliotecas de cDNA generadas a partir de células clorofílicas de *B. gracilis* bajo tratamientos de estrés osmótico. M: marcador de ADN Lambda HINDIII; carriles 1-22: clonas putativas positivas provenientes de la hibridación de la biblioteca de cDNA de células clorofílicas en tratamiento de 14% PEG con la sonda SOD.....70
- Figura 6.** Amplificación de algunas de las clonas putativas positivas provenientes de bibliotecas de cDNA generadas a partir de células clorofílicas bajo tratamientos de estrés osmótico de *B. gracilis*. 1 Kb: marcador de ADN (1kb); carriles 1-35: clonas provenientes de la hibridación de la sonda SOD con la biblioteca de células clorofílicas en tratamiento de 14% PEG; carriles 37-43: hibridación de la sonda 1_h08 con células de 21% PEG; carriles 44-48: hibridación de la sonda 2_f10 con células de 21% PEG; carriles 51-52: hibridación de la sonda 3_e02 con células de 14% PEG; carriles 53-64: hibridación de la sonda 3_e02 con células de 21% PEG; carriles 66-73: hibridación de la sonda BADH con células de 14% PEG; carriles 36,74-79: hibridación de la sonda BADH con células de 21% PEG.....72

LISTA DE CUADROS

Página

CAPÍTULO IV

Cuadro 1. Iniciadores utilizados para la hibridación en placa de las bibliotecas de cDNA.....	65
Cuadro 2. Secuenciación de clonas putativas positivas provenientes de bibliotecas de cDNA generadas a partir de células clorofílicas bajo tratamientos de estrés osmótico de <i>B. gracilis</i>	84

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

La escasez de agua es el principal problema para la producción de alimentos en áreas de temporal a nivel nacional y mundial. En México, las tierras secas (áridas, semiáridas y subhúmedas secas) se encuentran principalmente en los desiertos Sonorense y Chihuahuense y en las regiones centrales influenciadas por el efecto de sombra orográfica generada por las Sierras Madre Occidental y Oriental [1]. Las tierras secas de México, determinadas a partir del índice de aridez, ocupan aproximadamente 101.5 millones de hectáreas, poco más de la mitad de nuestro territorio. De esta superficie, las zonas áridas representan 15.7%; las semiáridas 58% y el 26.3% restante corresponde a las zonas subhúmedas secas. De acuerdo con el Censo de Población y Vivienda 2010 [2], en las tierras secas de México habitaban 33.6 millones de personas, que equivalían al 30% de la población del país. De ellas, 18.1% radicaba en localidades rurales y 81.9% en localidades urbanas por lo que para estas personas es difícil la producción de alimentos.

La sequía y la salinidad constituyen los principales obstáculos para la producción de alimentos a nivel mundial [3, 4]. En las regiones áridas y semiáridas de México la errática y escasa precipitación, comúnmente menos de 600 mm anuales, limita grandemente la actividad agrícola en áreas de temporal e influyen de manera determinante la dinámica y productividad de los cultivos y comunidades vegetales naturales [5].

Bajo estas premisas gran parte de los esfuerzos de mejoramiento genético clásico pudieran enfocarse a la obtención de plantas con una mayor tolerancia al estrés hídrico

explotando el repertorio genético vegetal dentro del cual diversas estrategias han evolucionado a través del tiempo para hacer frente al déficit de agua en el curso de la evolución.

El mejoramiento genético tradicional y molecular han contribuido poco a incrementar la tolerancia a la sequía de las plantas. La obtención de variedades con una mayor tolerancia a la sequía mediante proyectos de mejoramiento genético implica elevados costos, largos tiempos y, en ocasiones, complejos esquemas de análisis para la selección de materiales tolerantes o el arrastre de características ligadas no deseables en los materiales mejorados. Así, aunque se han obtenido algunos éxitos, el progreso global mediante estas herramientas ha sido lento [3]. El fortalecimiento de las herramientas moleculares con un creciente número de innovadores y poderosos desarrollos tecnológicos está impulsando fuertemente el análisis de la expresión genética diferencial de las plantas para el aislamiento de genes relacionados con factores ambientales como sequía, temperatura ó salinidad, procesos del desarrollo o estados fisiológicos de las plantas, entre otros [6].

Aunque la característica de tolerancia al estrés hídrico en las plantas es controlada por una gran variedad de genes que actúan sinérgica y aditivamente [7, 8] se ha teorizado sobre la posibilidad de generar plantas tolerantes al agobio hídrico mediante la transferencia de sólo uno o pocos genes [9]. Ejemplo puede ser la introducción de genes que codifiquen para enzimas asociadas a la síntesis de compuestos osmóticamente activos, transportadores, chaperonas o genes para aumentar la tolerancia hacia especies reactivas de oxígeno como aquellos relacionados con la síntesis de la superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa o glutatión peroxidasa [10].

Algunas plantas acumulan ciertos compuestos conocidos como solutos compatibles, osmolitos u osmorreguladores, y la alteración o incorporación de las vías conducentes a su biosíntesis podría aumentar su tolerancia al déficit hídrico. Entre los osmolitos mejor conocidos se encuentran compuestos de amonio cuaternario como glicina betaína, aminoácidos como prolina, y azúcares como manitol, sorbitol, sacarosa y trehalosa. Es por esto, que esfuerzos de mejoramiento genético tradicional y molecular se han enfocado hacia la acumulación de solutos compatibles en las células vegetales [11, 12, 13, 14].

Algunos metabolitos son de gran importancia para aumentar la tolerancia hacia la sequía en plantas, pero también existen algunas proteínas que responden al estrés, como las proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (LEA), las cuales puede funcionar en la detoxificación de especies reactivas de oxígeno y disminución de daño celular durante la deshidratación. La sobreexpresión de estas proteínas ha tenido como resultado el aumento a la tolerancia hacia la sequía [15]. Análisis bioquímicos recientes demuestran que LEA pueden prevenir la agregación de proteínas inducidas por la desecación y/o el congelamiento [16].

El pasto navajita azul (*Bouteloua gracilis*) [Willd. ex Kunth] Lag. ex Griffiths es una planta C₄ [17] altamente tolerante a la sequía, y por tanto, una fuente importante para el aislamiento de genes relacionados con estrés hídrico. Es considerada la gramínea más importante de los pastizales semiáridos de México, ya que tiene un alto valor forrajero [18, 19] y también es considerada el pastizal corto más importante de los Estados Unidos [20]. Una de las características más relevantes de esta gramínea y que explica su amplia distribución,

desde el sur de Canadá hasta las mesetas centrales de México, es su elevada tolerancia al pastoreo y a condiciones de agobio hídrico [21, 22].

Se cuenta ya con los primeros esquemas para el manejo biotecnológico del pasto *Bouteloua gracilis* [23, 24] y se han logrado obtener los primeros cultivos celulares clorofílicos dentro de la familia *Poaceae*. Esta línea celular es única en su tipo ya que además de acumular altas concentraciones de clorofila es tolerante a altas concentraciones de polietilenglicol (PEG) [25].

Los cultivos celulares constituyen importantes sistemas para el estudio y aislamiento de genes relacionados con estrés hídrico. Con base en sistemas celulares se han realizado diversos estudios relacionados con los procesos fisiológicos, moleculares y bioquímicos que operan durante el estrés salino, osmótico y por frío [26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35] y han permitido el aislamiento de genes relacionados con estrés osmótico y salino [36, 37].

Los cultivos celulares con altos contenidos de clorofila ofrecen ventajas adicionales como sistemas para el estudio y aislamiento de genes relacionados con estrés hídrico; entre otras ventajas, se puede mencionar que sirven como modelo para el estudio de la bioquímica, genética y fisiología celular debido a que ciertas enzimas del metabolismo vegetal se encuentran localizadas en los cloroplastos [38, 39]. Los cloroplastos son un blanco importante dentro de la biotecnología del estrés hídrico [40, 41] debido al confinamiento de ciertos solutos compatibles, o enzimas involucradas en su biosíntesis, en estos organelos. Por ejemplo, el osmoregulador glicina betaína se localiza principalmente en cloroplastos [42]

donde se estabiliza el aparato fotosintético, y por ende la tasa fotosintética, durante condiciones de estrés [43].

Las proteínas BADH (betaína aldehído deshidrogenasa) y colina monooxigenasa son enzimas involucradas en la biosíntesis de glicina betaína que se encuentran localizadas casi exclusivamente en el estroma de los cloroplastos [44, 45]. Los cloroplastos son un importante centro de producción de especies reactivas de oxígeno durante el estrés hídrico [46], por lo que cuentan con sistemas de detoxificación para la inactivación de radicales oxígeno y H_2O_2 que se generan en situaciones de deficiencia de agua [14].

Adicionalmente, en estos plastidios se encuentra codificada la información para la producción de la enzima (zeaxantina epoxidasa) que lleva a cabo la primera reacción de la biosíntesis de ABA mediante una epoxidación de la zeaxantina en anteraxantina y violaxantina [47]. Además de conocer la biosíntesis de ABA recientemente se ha descubierto un citocromo P450 CYP707A que ha sido identificado como un ABA 8'-hidroxilasa, el cual juega un papel central en la regulación de los niveles de ABA durante condiciones de estrés hídrico, por lo que puede ser posible que esto permita un control de los niveles de ABA y contribuir así en un avance hacia el aumento de la tolerancia a sequia [48, 49]. Con base en sistemas celulares clorofílicos se han llevado a cabo estudios sobre estrés osmótico [50] y estrés oxidativo [51] y se han logrado aislar genes relacionados con estrés oxidativo [52].

La línea celular clorofílica de *B. gracilis* es un sistema ideal para el estudio y obtención de genes relacionados con estrés hídrico, y podrían constituir un modelo ideal para el análisis de las respuestas vegetales al estrés osmótico e hídrico por las siguientes razones:

- a) *B. gracilis* muestra una elevada resistencia al déficit hídrico y las suspensiones celulares han mostrado ser muy tolerantes al estrés osmótico (al menos 25% PEG 8000 [24]).
- b) Las suspensiones celulares poseen cloroplastos, los cuales, como se mencionó anteriormente, se encuentran involucrados directa y activamente en la respuesta de las plantas al estrés hídrico y osmótico.
- c) Se sabe que esta gramínea acumula solutos compatibles en respuesta a deficiencia de agua [53].
- d) Es el pasto nativo de Norteamérica que quizá más se ha estudiado desde una perspectiva ecológica y fisiológica, por lo que se cuenta con bastante información sobre su comportamiento bajo condiciones de estrés hídrico.
- e) Por tratarse de una gramínea, los desarrollos biotecnológicos que pudieran generarse a partir de esta especie modelo podrían tener una mayor factibilidad de poderse aplicar a las plantas comestibles más importantes del mundo, los cereales.

Además, esta línea celular ya ha sido transformada a nivel nuclear con el gen *rolA*, bajo el control del promotor constitutivo 35S con el fin de determinar efectos asociados a la expresión de este gen en pastos. Las plantas transformadas se obtuvieron mediante biobalística empleando un protocolo diseñado para la transformación de células clorofílicas. Estas plantas desarrollaron vellosidades, mostraron reducción del sistema radicular, produjeron lo doble de follaje que las plantas control, y se comprobó la integración estable del transgen [54].

Para la búsqueda de secuencias que confieran alguna de las características mencionadas se emplea la construcción de bibliotecas de expresión o cDNA. La construcción de bibliotecas de cDNA es una herramienta para identificar genes con funciones específicas, además de identificar el comportamiento genético de un organismo en ciertas condiciones. Se han realizado diversos estudios exitosos en los cuales se utiliza diferentes organismos (planta, bacteria, hongos, levadura, peces) para identificar y aislar genes a partir de bibliotecas de cDNA, los cuales puedan ser utilizados para realizar transformación genética de plantas buscando incorporar nuevas características agronómicas deseables. Algunos de estos estudios se han realizado con *Escherichia coli*, para identificar genes que están implicados en promover la tolerancia a la salinidad en las plantas [55, 56]. Algunos autores construyeron una biblioteca de cDNA de la remolacha (planta halotolerante) para identificar el factor de iniciación eucariótico de la traducción ('eIF1A'), y al sobre expresar este factor promovieron la tolerancia a la salinidad en una levadura sensible al sodio y en *Arabidopsis* [56].

Las bibliotecas de cDNA también pueden ser útiles para buscar factores de transcripción, los cuales son reguladores críticos en el cambio de la expresión de genes en

condiciones de estrés abiótico; *Arabidopsis* contiene alrededor de 1500 factores de transcripción (TFs) en su genoma [56]. Estos factores pueden ser clasificados en diversas familias basados en la estructura de su dominio de unión. Caso concreto son las familias de factores MYB, MYC, ERF, bZIP, y WRKY los cuales están implicados en la regulación de respuesta al estrés [57].

Tanto activadores de la transcripción, como represores de ésta, han mostrado que pueden participar en el aumento de la tolerancia a sequía. La mayoría de estos genes han sido identificados y analizados en el modelo de estudio de *Arabidopsis*. Específicamente los factores de transcripción mejor caracterizados en la tolerancia hacia estrés abiótico son los genes AREB1 (proteína de unión en respuesta ABA 1), ABF2 (Factor 2 de unión en respuesta a ABA), DREB (proteína de unión en respuesta a deshidratación) [58].

Con la finalidad de buscar genes que aumenten la tolerancia a la sequía, se intenta elaborar bibliotecas de cDNA así como bibliotecas de DNA cloroplastidico, debido a que en este orgánulo se produce la mayoría de elementos que dañan la célula, como pueden ser las especies reactivas de oxígeno [59]. Se ha secuenciado y clonado una región de 2332 pb que comprende rna16S-trnI-trnA-rna23S del plastoma de *B. gracilis*, el cual tiene una similitud de alrededor del 92% con *Zea mays*, *Oryza sativa* y *Saccharum officinarum*, con el objetivo de en un futuro subclonar y generar plantas transplastoméricas de pasto navajita. El análisis de restricción e hibridación sugiere que el tamaño del plastoma de *B. gracilis* es cercano a las 130 Kb [60].

Con base en lo antes expuesto, los objetivos de la presente investigación fueron los siguientes:

OBJETIVOS

General:

- Estudiar los mecanismos celulares de tolerancia a la sequía en cultivos celulares clorofílicos de *Bouteloua gracilis*, y construir bibliotecas de cDNA de respuesta a estrés osmótico a partir de esta línea celular.

Específicos:

- Optimizar el método del per-ioduro para la determinación de glicina betaína en muestras recalcitrantes tales como el cultivo de células clorofílicas del pasto *Bouteloua gracilis*.
- Estudiar la concentración de osmolitos compatibles como prolina, glicina betaína y algunos azúcares (glucosa, sacarosa, fructuosa, trehalosa y almidón) relacionados con ajuste osmótico y tolerancia a la sequía de *Bouteloua gracilis* en células clorofílicas bajo simulación de sequía utilizando PEG.
- Construir bibliotecas de cDNA a partir de la línea celular clorofílica de *Bouteloua gracilis* sometida a estrés osmótico y aislar e identificar genes involucrados en la respuesta de esta gramínea a estrés hídrico.

HIPÓTESIS

- a) Se puede optimizar una técnica espectrofotométrica para poder utilizarla en la determinación de glicina betaína en muestras que contienen grandes cantidades de este osmolito tales como el cultivo de células clorofílicas de *Bouteloua gracilis*.
- b) Las concentraciones de osmolitos compatibles como prolina, glicina betaína y algunos azúcares (glucosa, fructuosa, trehalosa) incrementan en las suspensiones celulares de *Bouteloua gracilis* bajo condiciones de estrés osmótico permitiéndole en determinado momento el ajuste osmótico.
- c) La construcción de bibliotecas de cDNA a partir de las células clorofílicas de *B. gracilis*, permitirá la identificación y clonación de genes involucrados en la resistencia a sequía.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] UACH, Actualización de la delimitación de las zonas áridas, semiáridas y subhúmedas de México, a escala regional. Reporte final de proyecto de investigación. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, Edo. de México, 2011.
- [2] INEGI, Censo de Población y Vivienda 2010. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Aguascalientes, México, 2011.
- [3] J.S. Boyer, Plant productivity and environment, Science 218 (1982) 443-448.

- [4] G.O. Edmeades, J. Bolanos, H.R. Laffite, S. Rajaram, W. Pfeiffer, R.A. Fischer, Traditional approaches to breeding for drought resistance in cereals, in: F.W.G Baker (ed), Drought Resistance in Cereals. ICSU and CABL, Wallingford, U.K., 1989, pp. 27-52.
- [5] G.A. Aguado-Santacruz, E. García-Moya, Environmental factors and community dynamics at the southernmost part of the North American Graminetum. I. On the contribution of climatic factors to temporal variation in species composition, *Plant Ecology* 135 (1998) 13-29.
- [6] C.S. Somerville, Somerville, *Plant Functional Genomics*, *Science* 285 (1999) 380-383.
- [7] J. Dvorak, M.M. Noaman, S Goyal, J. Gorham, Enhancement of the salt tolerance of *Triticum turgidum* L. by the *Kna1* locus transferred from the *Triticum aestivum* L. chromosome 4D by homoeologous recombination, *Theor. Appl. Genet.* 87 (1994) 872-877.
- [8] C. Frova, P. Krajewski, N. di Fonzo, M. Villa, M. Sari-Gorla, Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. I. Yield components, *Theor. Appl. Genet.* 99 (1999) 280-288.
- [9] K.F. McCue, A.D. Hanson, Drought and salt tolerance: towards understanding and application, *Trends in Biotechnology* 8 (1990) 358-362.
- [10] T. Umezawa, M. Fujita, Y. Fujita, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki, Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future, *Current Opinion in Biotechnology* 17 (2006) 113-122.
- [11] R. Grumet, A.D. Hanson, Genetic evidence for an osmoregulatory function of glycinebetaine accumulation in barley, *Aust. J. Plant Physiol.* 13 (1986) 353-364.

- [12] H. Saneoka, C. Nagasaka, D.T. Hahn, W.-J. Yang, G.S. Premachandra, R.J. Joly, D. Rhodes, Salt tolerance of glycinebetaine-deficient and -containing maize lines, *Plant Physiol.* 107 (1995) 631-638.
- [13] W.-J. Yang, A. Nadolska-Orczyk, K.V. Wood, D.T. Hahn, P.J. Rich, A.J. Wood, H. Saneoka, G.S. Premachandra, C.C. Bonham, J.C. Rhodes, R.J. Joly, Y. Samaras, P.B. Goldsbrough, D. Rhodes, Near-isogenic lines of maize differing for glycinebetaine, *Plant Physiol.* 107 (1995) 621-630.
- [14] H.J. Bohnert, B. Shen, Transformation and compatible solutes, *Sci. Hort.* 78 (1999) 237-260.
- [15] D. Bartels, R. Sunkar, Drought and salt tolerance in plants, *Crit. Rev. Plant Sci.* 24 (2005) 23-58.
- [16] K. Goyal, L.J. Walton, A. Tunnacliffe, LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem J.* 388 (2005) 151-157.
- [17] J.J. Read, J.A. Morgan, Growth and partitioning in *Pascopyrum smithii* (C₃) and *Bouteloua gracilis* (C₄) as influenced by carbon dioxide and temperature, *Ann. Bot* 77 (1996) 487-496.
- [18] H. Vázquez B., Respuestas demográficas y esfuerzo reproductivo de *Bouteloua gracilis* bajo pastoreo continuo y exclusión en “El Gran Tunal”, San Luis Potosí, Tesis Profesional, Escuela de Agronomía, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, S.L.P., 1988.
- [19] M.S. Orozco A., Efecto de la profundidad de siembra y la fertilización en el establecimiento de tres zacates forrajeros, Tesis de Maestría en Ciencias, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México, 1993.

- [20] P.L. Sims, R.K. Lang'at, D.N. Hyder, Developmental morphology of blue grama and sand bluestem. *J. Range Manage.* 26 (1973) 340-344.
- [21] M.M. Hoover, M.A. Hein, W.A. Dayton, C.O. Erlanson, The main grasses for farm and home, in: A. Stefferud (ed.), *Grass. Yearbook of Agriculture*, United States Department of Agriculture, Washington, D.C., 1948, pp. 639-700.
- [22] B. Havard-Duclos, *Las Plantas Forrajeras Tropicales*. Blume Distribuidora, Barcelona, España, 1979.
- [23] G.A. Aguado-Santacruz, J.L. Cabrera-Ponce, V. Olalde-Portugal, M.R. Sánchez-González, J. Márquez-Guzmán, L. Herrera-Estrella, Tissue culture and plant regeneration of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. ex Steud, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 37 (2001) 82-189.
- [24] G.A. Aguado-Santacruz, J.L. Cabrera-Ponce, E. Ramírez-Chávez, C.G. León-Ramírez, Q. Rascón-Cruz, L. Herrera-Estrella. V. Olalde-Portugal, Establishment, characterization and plant regeneration from highly chlorophyllous embryogenic cell cultures of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag ex. Steud, *Plant Cell Rep.* 20 (2001) 131-136.
- [25] X. García-Valenzuela, E. García-Moya, Q. Rascón-Cruz, L. Herrera-Estrella, G.A. Aguado-Santacruz, Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyllic cells, *J. Plant Physiol.* 162(2005) 650-661.
- [26] R.A. Bressan, A.K. Handa, S. Handa, P.M. Hasegawa, Growth and water relations of cultured tomato cells after adjustment to low external water potentials, *Plant Physiol.* 70 (1982) 1303-1309.
- [27] S. Bhaskaran, R.H. Smith, R.J. Newton, Physiological changes in cultured sorghum cells in response to induced water stress. I. Free proline, *Plant Physiol.* 79 (1985) 266-269.

- [28] H.-J. Hawkins, S.H. Lips, Cell suspension cultures of *Solanum tuberosum* L. as a model system for N and salinity response effect of salinity on NO₃⁻ uptake and PM-ATPase activity, *J. Plant Physiol.* 150 (1997) 103-109.
- [29] A. Tholakalabavi, J.J. Zwiazek, T.A. Thorpe, Effect of mannitol and glucose-induced osmotic stress on growth, water relations and solute composition of cell suspension cultures of poplar (*Populus deltoides* var. *occidentalis*) in relation to anthocyanin accumulation. *In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant* 30P (1994) 164-170.
- [30] M.S. Santos-Díaz, N. Ochoa-Alejo, PEG-tolerant cell clones of chili pepper: growth, osmotic potentials and solute accumulation, *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.* 37 (1994) 1-8.
- [31] M.S. Santos-Díaz, N. Ochoa-Alejo, Effect of water stress on growth, osmotic potential and solute accumulation in cell cultures from chili pepper (a mesophyte) and creosote bush (a xerophyte), *Plant Sci.* 96 (1994) 21-29.
- [32] A. Leonardi, S. Heimovaara-Dijkstra, M. Wang, Differential involvement of abscisic acid in dehydration and osmotic stress in rice cell suspension. *Physiol. Plant.* 93 (1995) 31-37.
- [33] A.J. Robertson, M. Ishikawa, L.V. Gusta, The effect of prolonged abscisic acid treatment on the growth, freezing tolerance and protein patterns of *Bromus inermis* (Leyss) cell suspensions cultured at either 3° or 25° C, *J. Plant Physiol.* 145 (1995) 137-142.
- [34] A. Tholakalabavi, J.J. Zwiazek, J.J. T.A. Thorpe, Osmotically-stressed poplar cell cultures: anthocyanin accumulation, deaminase activity, and solute composition, *J. Plant Physiol.* 151 (1997) 489-496.
- [35] A.-C. Cazalé, M.-A. Rouet-Mayer, H. Barbier-Brygoo, Y. Mathieu, C. Laurière, Oxidative burst and hypoosmotic stress in tobacco cell suspensions, *Plant Physiol.* 116 (1998) 659-669.

- [36] M. Umeda, C. Hara, Y. Matsubayashi, H.-H. Li, Q. Liu, F. Tadokoro, S. Aotsuka, H. Uchimiya, Expressed sequence tags from cultured cells of rice (*Oryza sativa* L.) under stressed conditions: analysis of transcripts of genes engaged in ATP-generating pathways, *Plant Mol. Biol.* 25 (1994) 469-478.
- [37] Y.M. Verástegi-Peña, Expresión diferencial de mRNAs de células de chile (*Capsicum annuum* L.) tolerantes a polietilenglicol (PEG), Tesis de Maestría en Ciencias, CINVESTAV-Unidad Irapuato, Irapuato, Gto., México, 1999.
- [38] J. Joyard, E. Teyssier, C. Miège, D. Berny-Seigneurin, E. Maréchal, M.A. Block, A.-J. Dorne, N. Rolland, G. Ajlani, R. Douce, The biochemical machinery of plastid envelope membranes, *Plant Physiol.* 118 (1998) 715-723.
- [39] J.M. Widholm, Properties and uses of photoautotrophic plant cell cultures. *Int. Rev. Cytol.* 132 (1992) 109-175.
- [40] H. Hayashi, Alia, L. Mustardy, P. Deshnum, M. Ida, N. Murata, Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxydase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress, *The Plant J.* 12 (1997) 133-142.
- [41] A. Sakamoto, N. Murata, Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold, *Plant Mol. Biol.* 38 (1998) 1011-1019.
- [42] S.P. Robinson, G.P. Jones, Accumulation of glycinebetaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress, *Aust. J. Plant Physiol.* 13 (1986) 659-668.
- [43] D. Rhodes, A.D. Hanson, Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44 (1993) 357-384.
- [44] P. Weigel, E.A. Weretilnyk, A.D. Hanson, Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 82 (1986) 753-759.

- [45] R. Brouquisse, P. Weigel, D. Rhodes, C.F. Yocum, A.D. Hanson, Evidence for a ferredoxine-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma, *Plant Physiol.* 90 (1989) 322-329.
- [46] G. Noctor, C.H. Foyer, Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49 (1998) 249-279.
- [47] E. Marin, L. Nussaume, A. Quesada, M. Gonneau, B. Sotta, P. Hugueney, A. Frey, A. Marion-Poll, Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the *ABA* locus of *Arabidopsis thaliana*, *EMBO J.* 15 (1996) 2331-2342.
- [48] S. Saito, N. Hirai, C. Matsumoto, H. Ohgashi, D. Ohta, K. Sakata, M. Mizutani, Arabidopsis CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid, *Plant Physiol.* 134 (2004) 1439-1449.
- [49] T. Kushiro, M. Okamoto, K. Nakabayashi, K. Yamagishi, S. Kitamura, T. Asami, N. Hirai, T. Koshiba, Y. Kamiya, E. Nambara, The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism, *EMBO J.* 23 (2004) 1647-1656.
- [50] M.E. Willenbrink, W. Husemann, Photoautotrophic cell suspension cultures from *Mesembryanthemum crystallinum* and their response to salt stress, *Bot. Acta* 108 (1995) 497-504.
- [51] C. Bladier, P. Carrier, P. Chagvardieff, Light stress and oxidative cell damage in photoautotrophic cell suspension of *Euphorbia characias* L., *Plant Physiol.* 106 (1994) 941-947.

- [52] K. Tanaka, S. Takio, I. Yamamoto, T. Satoh, Purification of the cytosolic CuZn-superoxide dismutase (CuZn-SOD) of *Marchantia paleacea* var. *diptera* and its resemblance to CuZn-SOD from chloroplasts, *Plant Cell Physiol.* 37 (1996) 523-529.
- [53] K. Wisiol, Clipping of water-stressed blue grama affects proline accumulation and productivity, *J. Range Manage.* 32 (1979) 194-195.
- [54] G.A. Aguado-Santacruz, Q. Rascón-Cruz, J.L. Cabrera-Ponce, A. Martínez-Hernández, V. Olalde-Portugal, L. Herrera-Estrella, Transgenic plants of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. ex Steud., from microprojectile bombardment of highly chlorophyllous embryogenic cells, *Theor. Appl. Genet.* 104 (2002) 763-771.
- [55] S.G. Mundree, A. Whittaker, J.A. Thomson, J.M. Farrant, An aldose reductase homolog from the resurrection plant *Xerophyta viscosa* Baker, *Planta* 211 (2000) 693-700.
- [56] A. Rausell, R. Kanhonou, L. Yenush, R. Serrano, R. Ros, The translation initiation factor eIF1A is an important determinant in the tolerance to NaCl stress in yeast and plants. *Plant J.* 34 (2003) 257-267.
- [57] K.B. Singh, R.C. Foley, L. Oñate-Sánchez, Transcription factors in plant defense and stress responses, *Curr. Opin. Plant Biol.* 5 (2002) 430-436.
- [58] H. Abe, T. Urao, T. Ito, M. Seki, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki, Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15 (2003) 63-78.
- [59] D. Betancourt, Mapa físico del genoma de cloroplasto de *Bouteloua gracilis* como herramienta molecular de análisis, Tesis de Maestría en Ciencias, FCQ UACH Chihuahua, Chihuahua, Chih., 2007.

[60] G.A. Aguado-Santacruz, D.A.Betancourt-Guerra, T. Siquerios-Cendón, S. Arévalo-Gallegos, B.E. Rivera-Chavira, G.E. Nevarez-Moorillon, B. Moreno-Gómez, Q. Rascón-Cruz, Comparison of the structure and organization of the rna operons of *Bouteloua gracilis* and *Zea mays*, Can. J. Plant Sci. 91 (2011) 107-116.

CAPÍTULO II

MÉTODO CONFIABLE PARA LA DETERMINACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA DE GLICINA BETAÍNA EN CULTIVO DE CÉLULAS EN SUSPENSIÓN¹

RESUMEN

La glicina betaína es un compuesto de amonio cuaternario que se acumula en una gran variedad de especies en respuesta a diferentes tipos de estrés. La glicina betaína contrarresta efectos adversos causados por factores abióticos, previniendo la desnaturalización e inactivación de proteínas. Es por ello, que su determinación es importante, principalmente para científicos enfocados en relacionar respuestas estructurales, bioquímicas, fisiológicas y/o moleculares de plantas con respecto al estado del agua. En el presente trabajo, se optimizó la técnica de per-yoduro para la determinación de los niveles de glicina betaína. Estas modificaciones permitieron analizar un gran número de muestras provenientes de una línea celular clorofílica del pasto *Bouteloua gracilis*. Se realizaron cinéticas de crecimiento en las células clorofílicas para determinar los niveles de glicina betaína en células control (sin estrés) y células estresadas osmóticamente con 14% ó 21% de polietilén glicol 8000. Después de la extracción de glicina, se evaluaron diferentes longitudes de onda y tiempos de lectura en un espectrofotómetro para determinar las condiciones óptimas de cuantificación para este osmolito. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se realizaron las lecturas a una longitud de onda de 290 nm y después de 48 h de disolver los cristales de glicina betaína en 1,2-dicloroetano. Esperamos que estas modificaciones proporcionen un método simple, rápido, confiable y barato para la determinación de glicina betaína en muestras de plantas y suspensiones de cultivos celulares.

Palabras clave: Glicina betaína, cultivos celulares, estrés, compuestos de amonio cuaternario.

¹ Enviado en su versión en inglés para publicación como artículo científico en la revista Analytical Biochemistry

A RELIABLE METHOD FOR SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF GLYCINE BETAININE IN A CELL SUSPENSION CULTURE

SUMMARY

Glycine betaine is a quaternary ammonium compound that accumulates in a large variety of species in response to different types of stress. Glycine betaine counteracts adverse effects caused by abiotic factors, preventing the denaturation and inactivation of proteins. Thus, its determination is important, particularly for scientists focused on relating structural, biochemical, physiological and/or molecular responses to plant water status. In the present work, we optimized the per-iodide technique for the determination of glycine betaine levels. This modification permitted large numbers of samples from a chlorophyllic cell line of the grass *Bouteloua gracilis* to be analyzed. Growth kinetics were assessed in the chlorophyllic suspension to determine glycine betaine levels in control (no stress) cells and cells osmotically stressed with 14 or 21% polyethylene glycol 8000. After glycine extraction, different wavelengths and reading times were evaluated in a spectrophotometer to determine the optimum quantification conditions for this osmolyte. Optimal results were obtained when readings were taken at a wavelength of 290 nm at 48 h after dissolving glycine betaine crystals in dichloroethane. We expect this modification to provide a simple, rapid, reliable and cheap method for glycine betaine determination in plant samples and cell suspension cultures.

Keywords: Glycine betaine, cell cultures, stress, quaternary ammonium compounds.

INTRODUCTION

On a global scale, water shortage is the main ecological problem for food production by rainfed agriculture. Consequently, a significant portion of genetic improvement efforts are aimed at obtaining plants with higher tolerance for water stress. Tolerance to water stress in plants is controlled by several genes that act in an additive manner [1,2].

A substantial increase in the cellular concentrations of osmotically active compounds, termed compatible solutes, has been observed in a vast number of organisms in response to salinity or drought stress [3,4,5]. Inorganic solutes such as K^+ , Na^+ and Cl^- can also increase during osmotic stress, but Na^+ and Cl^- interfere with cellular activities and have to be compartmentalized within the vacuole [6]. For a solute to be compatible, a considerable increase in its concentration must not interfere with the normal metabolic functions of the cell. Some of the best-known osmolytes contain quaternary ammonium (glycine betaine); amino acids (proline, glycine, taurine); polyols (glycerol, inositol, sorbitol) and their derivatives (methyl-inositol); or sugars (mannitol, sorbitol, sucrose and trehalose); among others. How these compatible solutes protect cells against damage from osmotic stress is still a matter of debate [7,8]. An early hypothesis was that compatible solutes may help cells conserving remnant water by a biophysical mechanism in which these compounds function as water-attracting or water-conserving molecules, thereby maintaining cell turgor. The hydrophilic nature of these compounds has supported the proposal that compatible solutes can stabilize proteins and cell structures [3] by replacing water at the surface of proteins, protein complexes or membranes. A third hypothesis is that compatible solutes function as scavengers of reactive oxygen species [9].

Glycine betaine (GB) is an amphiphilic molecule possessing a hydrophobic positive end and a hydrophilic negative end, and it is electrically neutral over a wide range of pH values [10]. This osmolyte is synthesized in several families of plants, such as family *Chenopodiaceae*, *Amaranthaceae*, *Avicenniaceae*, *Gramineae*, *Compositae*, *Convolvulaceae*, *Plumbaginaceae*, *Solanaceae*, *Leguminosae*, *Asteraceae*, *Malvaceae*, *Poaceae*, *Portulacaceae*, and *Caryophyllaceae*. However, few families are able to accumulate quantities of this osmolyte sufficient to achieve an osmotic effect [11]. In higher plants, the enzymes involved in GB synthesis are located in the chloroplast stroma [12,13].

GB is the most effective compatible solute for the improvement of salinity and drought tolerance in higher plants [14]. By interacting with both hydrophilic and hydrophobic domains of macromolecules, this osmolyte is involved in reducing lipid peroxidation [15], neutralizing high NaCl concentrations [16], maintaining thylakoid membrane integrity [17], and stabilizing the structure of proteins from the damaging effects of abiotic factors such as drought, salinity, and freezing [10].

The properties of osmolytes are useful in agriculture, cell biology and biotechnology [15,16] because they are indicators of suboptimal environmental conditions. In particular, plant breeders interested in developing crops with a superior tolerance to drought, salinity and freezing require reliable, efficient and affordable techniques for detecting osmolytes in a time-efficient, low-cost and rapid manner. On the other hand, experimental evidence shows that overexpression or incorporation of the biosynthesis routes of some osmolytes in the genome can result in increased tolerance to abiotic factors in plants [9].

Plant cell cultures are important systems for the study and isolation of genes related to water tolerance. Using these biological systems, several studies have been performed to analyze the physiological, molecular, and biochemical processes operating during saline stress [18], osmotic stress [19,20,21,22,23], and cold [24].

Cell cultures with high chlorophyll contents, such as the chlorophyllic system studied in this work, offer additional advantages because certain enzymes of the plant's metabolism are located in chloroplasts [25,26]. Chloroplasts are important within the biotechnology of water stress [27,28] due to the confinement of certain compatible solutes (or enzymes involved in their biosynthesis) in these cellular compartments. For example, the osmoregulator glycine betaine is mainly located in chloroplasts [29], where it stabilizes the photosynthetic apparatus, and therefore the photosynthetic rate, during stressful conditions [30].

Determination of glycine betaine levels currently requires sophisticated and costly equipment such as a refraction index detector [31], mass spectrometer [32,33], nuclear magnetic resonance spectroscopy [9] and pyrolytic instrumentation.

Grieve and Grattan [34], Stumpf [35], and Arakawa [36] developed different methods for determining this compound using affordable equipment such as the spectrophotometer. Currently, the per-iodide method of Grieve and Grattan [34] is the method most widely used to precipitate quaternary ammonium compounds for glycine betaine determination. This technique, although successful in a large variety of species, is not efficient when applied to

certain systems, such as the plant cell suspension culture analyzed here, because they contain large amounts of quaternary ammonium compounds which results in GB sedimentation, making this technique erratical, tedious and time-consuming.

The aim of this research was to optimize the per-iodide method for determining glycine betaine levels in recalcitrant samples such as chlorophyllic cell cultures of the grass *Bouteloua gracilis*.

MATERIALS AND METHODS

Chlorophyllic cell suspension growth kinetics

Bouteloua gracilis chlorophyllic cells were routinely cultivated in 125 mL flasks containing 25 mL liquid MPC medium under optimal growth conditions [37]: continuous fluorescent light, $77 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$; temperature $33 \pm 1^\circ\text{C}$, and shaking at 90 rpm. The MPC medium contained the basal salts and vitamins of MS medium [38], 2 mg L^{-1} 6-benzylaminopurine (BAP), 1 mg L^{-1} 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 40 mg L^{-1} adenine and 3% (w/v) sucrose. The pH of the medium was adjusted to 5.8 before sterilization (120 °C/15 min).

Growth kinetics were assessed by culturing the chlorophyllic cells under either normal or hyperosmotic conditions. Osmotic treatment was achieved by adding polyethylene glycol 8000 (PEG 8000) to the basal MPC medium at concentrations of 14% PEG or 21% PEG. An

initial 8-day stock cell culture was used to inoculate 0.4 g FW cells into 120 mL flasks containing 25 mL of the different liquid media. The cells from the initial stock culture were considered as the day 0 material of the growth kinetics. All cell growth kinetics were assessed under the same environmental conditions described before for the routine culture of the chlorophyllous cells. After initial sampling at day 0, cells were further collected at days 3, 6, 9 and 12 after inoculation of the 120 flasks (10 repetitions per treatment). Complete cell growth kinetics including MPC, 14% PEG and 21% PEG treatments were repeated at least 4 times. All harvested cell material was lyophilized for further glycine betaine determinations.

Glycine betaine determination

The concentration of glycine betaine was determined for all treatments and sampling dates using a modification of the method of Grieve and Grattan [34], which is described following. H_2SO_4 (1.5 mL of 2N) was added to 1 mg lyophilized cells, and the mixture was then heated to 60 °C in an Eppendorf ThermoMixer ®C for 10 min; this step permits extraction of the quaternary ammonium compounds. To precipitate the cells and recover the supernatant, the mixture was centrifuged at 14,000 rpm for 10 min at room temperature. Because our material contained large amounts of glycine betaine, dilutions had to be performed as follows: dilution 1:1 = 250 μL supernatant + 0 μL H_2SO_4 2N (Calibration curve), using a standard (from SIGMA-Aldrich, St. Louis USA); dilution 1:2 = 125 μL supernatant + 125 μL H_2SO_4 2N (Control samples); dilution 1:4 = 62.5 μL supernatant + 187.5 μL H_2SO_4 2N (14 and 21% PEG treated samples). Later, they were mixed and placed in a new tube containing 125 μL sample + 50 μL cold KI-I₂ (prepared with 15.7 g of iodine and

20 g of KI in 100 mL of sterilized water). This latter compound causes the precipitation of glycine betaine in the form of golden crystals.

After adding KI-I₂, the remaining steps were performed in the dark because light changes the color of the samples. Following, the samples were stirred gently to prevent the mixture from reacting with remnants of KI-I₂ deposited on the lid of the Eppendorf tube, which results in undesirable staining of the mixture. The tubes were stored at 0 to 4 °C for 16 h and then centrifuged at 14,000 rpm for 30 min at 0 °C. The supernatant was carefully eliminated so that only crystals of glycine betaine remained fixed to the walls and the bottom of the tubes; samples should always be managed at low temperatures because glycine betaine crystals easily dissolve in the medium when the temperature is higher than 0°C. The precipitate was then diluted into 1.4 mL of 1,2-dichloroethane, and finally, the absorbance was read using a spectrophotometer.

To determine the optimal wavelength and time for reading samples, the following tests were performed. First, the wavelengths 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 365, 400, 467, 500, 550 and 600 nm were evaluated for optimal determination of glycine betaine. After determining the optimal wavelength, the following times after dissolving the samples in 1,2-dichloroethane were tested: 24, 26, 28, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 68 and 144 h.

RESULTS AND DISCUSSION

The calibration curve for glycine betaine was successfully elaborated using the method described by Grieve and Grattan [34], although the glycine crystals hardly dissolved in the 1,2-dichloroethane particularly in samples containing high levels of glycine betaine (Figura 1).

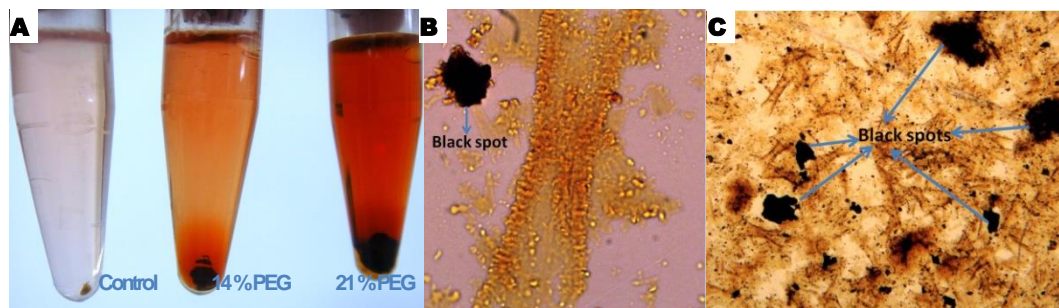


Figura 1. Glycine betaine crystals and their sedimentation. A) Sedimentation of glycine betaine in chlorophyllic cell growth cultures treated with 0, 14 or 21% PEG. B) Glycine betaine crystals observed at 40x. C) Glycine betaine crystals observed at 50x.

As shown in Figura 1, glycine betaine completely dissolved in the control unstressed samples but not in cell samples treated with PEG-8000, which accumulated significant amounts of this osmolyte. The strategy used to solve this problem was to use the lowest amount of lyophilized cells (1 mg) and then perform dilutions with H_2SO_4 2N.

After the cells were weighed (1 mg), rather than shaking them in deionized water for 24 h (as indicated by Grieve and Grattan [34]), the samples were treated with 1.5 mL H_2SO_4 2N and heated at 60 °C for 10 min; following this modification the same results were achieved in less time.

Another important contribution to the original method was to perform the steps subsequent to the addition of KI-I₂ in the dark, because it was clear that exposure of the samples to the light clearly altered their color and consequently erratical readings were obtained in the spectrophotometer.

Likewise, samples with KI-I₂ should to be shaken slowly and carefully to prevent the mixture from contacting the lid of the Eppendorf tube because the glycine crystals diluted in 1,2-dichloroethane will react with KI-I₂ remaining on the lid, turning the original yellow color of the mixture into light pink, which newly produced unexact readings in the spectrophotometer.

Figuras 1B and C show glycine betaine crystals with some black spots that probably correspond to other quaternary ammonium compounds and free forms of periodide. Grieve and Grattan [34] mentioned that total quaternary ammonium compounds are precipitated as periodide complexes when an acidic pH is used.

Tests were performed to determine the optimum wavelength for reading the glycine betaine samples in the spectrophotometer. The wavelengths evaluated ranged from 300 to 600 nm at 50 nm intervals. Instead of considering wavelengths of 350 and 450 nm, we initially evaluated the wavelengths 365 [34] and 467 nm [35]. When comparing the trends of the lines in Figuras 2A and B, the calibration curve shows that glycine betaine is best determined at wavelengths of 300 to 365 nm because the readings observed between 400 and 550 nm

(Figura 2A) not only corresponded to glycine betaine but also to other quaternary ammonium compounds. Considering these results, a new wavelength sweep was performed from 280 to 365 nm at 10 nm intervals (Figura 3).

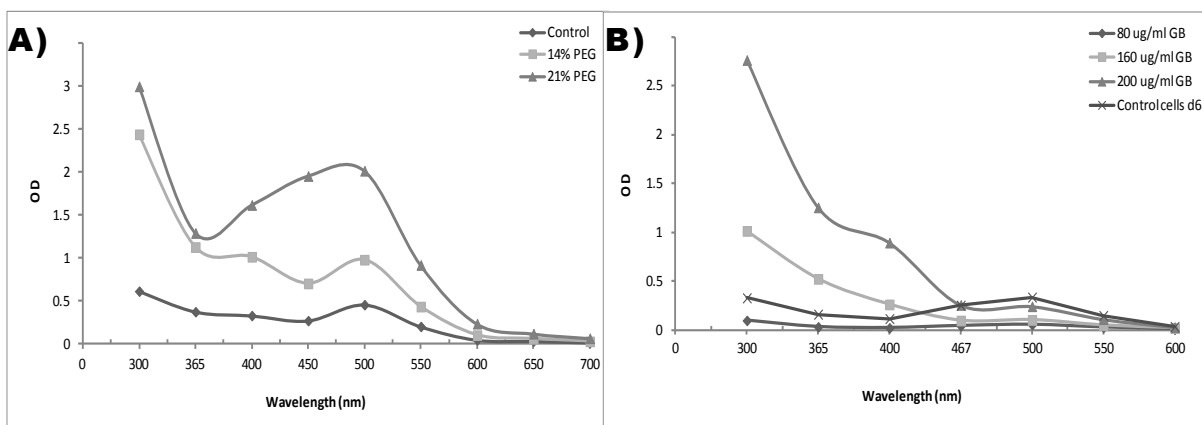


Figure 2. Evaluation of the optimal wavelength for glycine betaine determination within the range 300 to 600 nm. Readings of the 0, 14, and 21% PEG treatments 2.5 h after dissolving the crystals in 1,2-dichloroethane (A). Three-point reading of the calibration curve and the control treatment 2.5 h after dissolving the crystals (B).

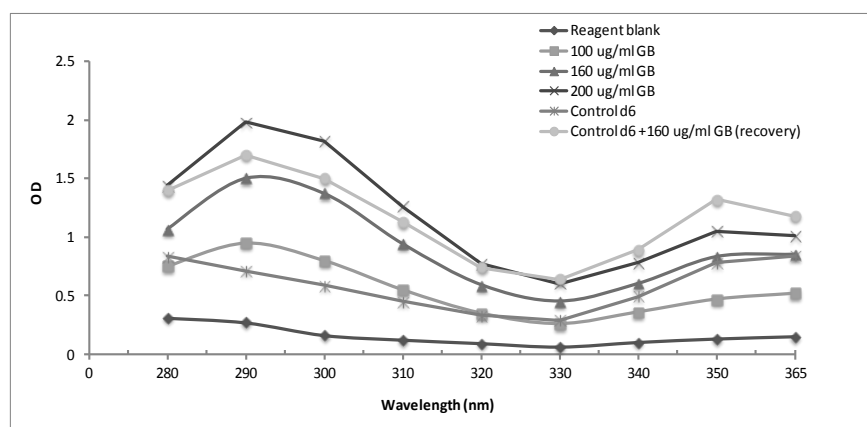


Figure 3. Evaluation of the optimal wavelength for glycine betaine determination within the range 280 to 365 nm.

Figura 3 shows that when samples are read at a wavelength of 290 nm, there is a greater difference between the different points of the calibration curve, controls, and recovery; therefore, this wavelength was best suited for the glycine betaine determinations.

Grieve and Grattan [34] mention in their methodology that readings of glycine betaine in the spectrophotometer must be performed 2 to 2.5 h after dissolving the crystals in 1,2-dichloroethane. Figuras 2 B, 4 A, and 4 B show readings taken at different times. The values observed in the calibration curve did not change, although the OD (optical density) value of the control cells read at day 6 (control cells, d6) increased with time, providing the highest concentration when the reading was performed 21 h after dissolving the glycine betaine crystals in 1,2-dichloroethane. This phenomenon may indicate that more time is required to dissolve the glycine betaine crystals in samples obtained from *B. gracilis* chlorophyllic cells. Therefore, tests were performed to determine the adequate time at which the samples should be read.

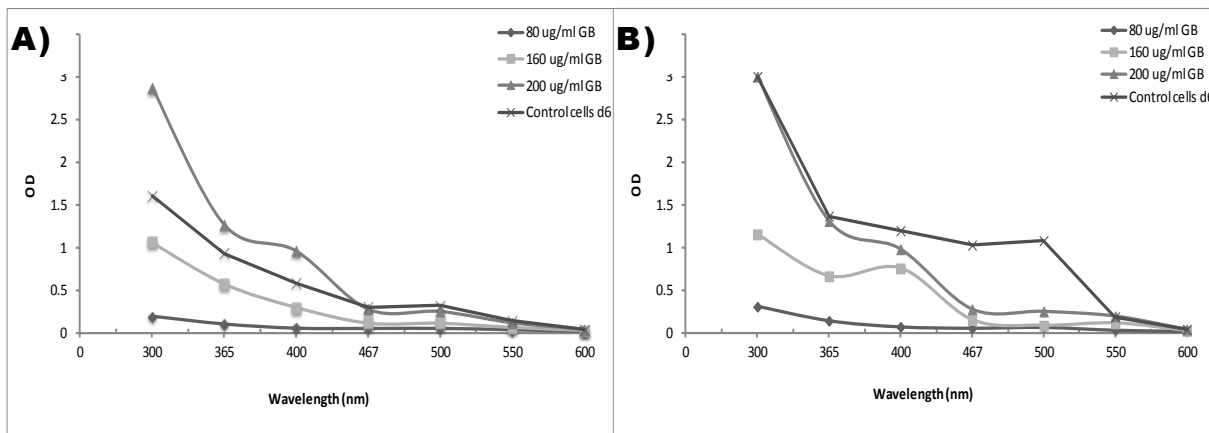


Figura 4. Evaluation of optimal reading time for samples of glycine betaine derived from *B. gracilis* chlorophyllic cells. Three-point reading of the calibration curve and the control treatment 6 h after dissolving the crystals in 1,2-dichloroethane (A). Readings taken after 12 h of the dissolution step (B).

Figura 5 shows again that the concentrations of glycine betaine obtained in the calibration curve do not vary with time, unlike the readings performed with the chlorophyllic cell samples. The adequate time to take the cell sample readings was within the 44- to 48-hour range. After this time, the readings increased very slightly, although the value of the reagent blank also increased, and the values decrease gradually.

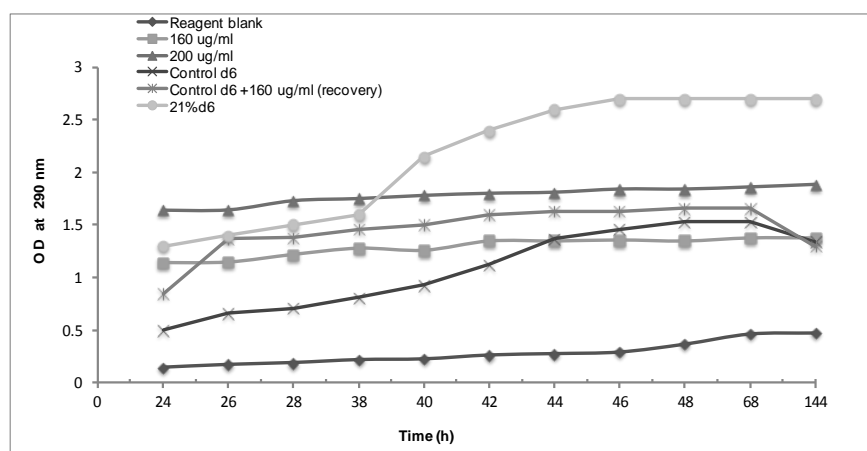


Figura 5. Readings at 290 nm wavelength and different times after glycine betaine crystals dissolution in 1,2-dichloroethane.

Once the previous parameters were optimized, the readings for the glycine betaine calibration curve and for the cell growth kinetics samples were performed at a wavelength of 290 nm and 48 h after dissolving the crystals in 1,2-dichloroethane. For the calibration curve, the concentrations considered were 150, 200, 250, and 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ glycine betaine because the OD values obtained at these concentrations fall within the overall readings registered in all treatments (Figura 6).

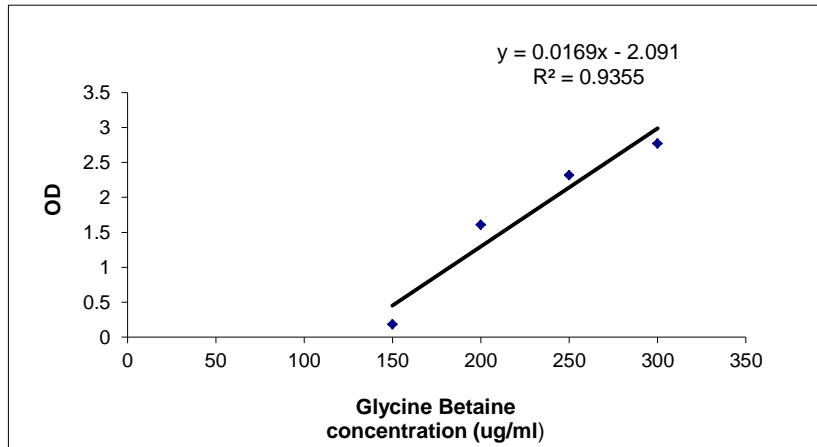


Figure 6. Glycine betaine calibration curve obtained after optimization of wavelength and reading time after dissolution of glycine betaine crystals in 1,2-dichloroethane.

Greater concentrations of glycine betaine were observed in the cells that underwent osmotic stress due to gene expression generated by the high concentration of polyethylene glycol. The highest concentration of glycine betaine (1413 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW) was obtained in chlorophyllic cells treated with 21% PEG. However, glycine betaine peaked at day three in cells treated with 14 or 21% PEG (Figure 7); this differential represents a three-fold increase in osmotically treated cells in comparison to control cells.

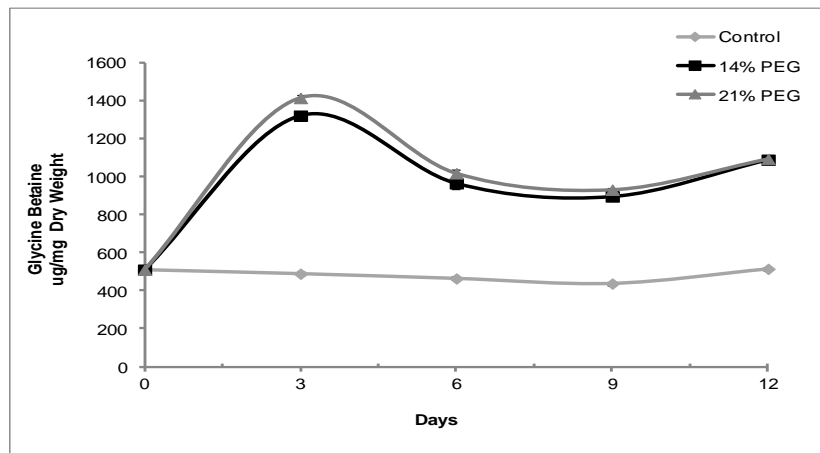


Figure 7. Concentration of glycine betaine obtained after averaging the results of the four cell growth kinetics assessments performed for all osmotic treatments.

CONCLUSIONS

The technique developed by Grieve and Grattan [34] was optimized to achieve fast and reliable spectrophotometric determinations of glycine betaine in samples containing high levels of quaternary ammonium compounds such as the chlorophyllic cells of the very drought-tolerant grass *Bouteloua gracilis*. Modifications to the original protocol included reading the samples at an optimal wavelength of 290 nm and allowing an adequate time (48 h) after dissolving the glycine betaine crystals in 1,2-dichloroethane. After correction of the original protocol, the readings from cells treated with 14 or 21% polyethylene glycol were highest at day three of the cell culture, and the highest values of glycine betaine was obtained in cells treated with 21% PEG.

REFERENCES

- [1] C. Frova, P. Krajewski, N. Di Fonzo, M. Villa, M. Sari-Gorla, Genetic analysis of drought tolerance in maize by molecular markers. I. Yield components, *Theor. Appl. Genet.* 99 (1999) 280-288.
- [2] X. Zhang, G. Lu, W. Long, X. Zou, F. Li, T. Nishio, Recent progress in drought and salt tolerance studies in *Brassica* crops, *Breed. Sci.* 64 (2014) 60-73.
- [3] P.H. Yancey, M.E. Clark, S.C. Hand, R.D. Bowlus, G.C. Somero, Living with water stress: Evolution of osmolyte systems, *Science* 217 (1982) 1214-1222.
- [4] D. LeRudulier, A.R. Strom, A.M. Dandekar, L.T. Smith, R.C. Valentine, Molecular biology of osmoregulation, *Science* 224 (1984) 1064-1068.

- [5] A.J. Delauney, D.P.S. Verma, Proline biosynthesis and osmoregulation in plants, *Plant J.* 4 (1993) 215-223.
- [6] P.M. Hasegawa, R.A. Bressan, A.K. Handa, Cellular mechanisms of salinity tolerance, *Hortscience* 21 (1987) 1317-1324.
- [7] H.J. Bohnert, B. Shen, Transformation and compatible solutes, *Sci. Hort.* 78 (1999) 237-260.
- [8] R. Serraj, T.R. Sinclair, Osmolyte accumulation: Can it really help increase in crop yield under drought conditions?, *Plant Cell Environ.* 25 (2002) 333-341.
- [9] K. Shirasawa, T. Takabe, T. Takabe, S. Kishitani, Accumulation of glycinebetaine in rice plants that overexpress choline monooxygenase from spinach and evaluation of their tolerance to abiotic stress, *Ann. Bot.* 98 (2006) 565-571.
- [10] G.C. Papageorgiou, N. Murata, The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving photosystem II complex, *Photosynth. Res.* 44 (1995) 243-252.
- [11] M. Pessarakli, *Handbook of plant and crop physiology*, Second ed., Marcel Dekker, Arizona, 2002.
- [12] R. Brouquisse, P. Weigel, D. Rhodes, C.F. Yocum, A.D. Hanson, Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma, *Plant Physiol.* 90 (1989) 322-329.
- [13] P. Weigel, E.A. Weretilnyk, A.D. Hanson, Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts, *Plant Physiol.* 82 (1986) 753-759.

- [14] K. Satoh, N. Murata, Stress responses of photosynthetic organisms. Molecular mechanisms and molecular regulations, Elsevier, Amsterdam, 1998.
- [15] J.C. Cushman, Osmoregulation in plants: implications for agriculture, Amer. Zool. 41 (2001) 758-769.
- [16] P.H. Yancey, Water stress, osmolytes and proteins, Amer. Zool. 41 (2001) 699-709.
- [17] P.M. Hasegawa, R.A. Bressan, J.-K. Zhu, H.J. Bohnert, Plant cellular and molecular responses to high salinity, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51 (2000) 463-499.
- [18] H.-J. Hawkins, S.H. Lips, Cell suspension cultures of *Solanum tuberosum* L. as a model system for N and salinity response effect of salinity on NO₃⁻ uptake and PM-ATPase activity, J. Plant Physiol. 150 (1997) 103-109.
- [19] R.A. Bressan, A.K. Handa, S. Handa, P.M. Hasegawa, Growth and water relations of cultured tomato cells after adjustment to low external water potentials, Plant Physiol. 70 (1982) 1303-1309.
- [20] S. Bhaskaran, R.H. Smith, R.J. Newton, Physiological changes in cultured sorghum cells in response to induced water stress. I. Free proline, Plant Physiol. 79 (1985) 266-269.
- [21] M.S. Santos-Díaz, N. Ochoa-Alejo, PEG-tolerant cell clones of chili pepper: growth, osmotic potentials and solute accumulation, Plant Cell Tiss. Org. 37 (1994a) 1-8.
- [22] M.S. Santos-Díaz, N. Ochoa-Alejo, Effect of water stress on growth, osmotic potential and solute accumulation in cell cultures from chili pepper (a mesophyte) and creosote bush (a xerophyte), Plant Sci. 96 (1994b) 21-29.

- [23] A. Tholakalabavi, J.J. Zwiazek, T.A. Thorpe, Osmotically-stressed poplar cell cultures: anthocyanin accumulation, deaminase activity, and solute composition, *J. Plant Physiol.* 151 (1997) 489-496.
- [24] A.J. Robertson, M. Ishikawa, L.V. Gusta, The effect of prolonged abscisic acid treatment on the growth, freezing tolerance and protein patterns of *Bromus inermis* (Leyss) cell suspensions cultured at either 3 degrees or 25 degrees C, *J. Plant Physiol.* 145 (1995) 137-142.
- [25] J.M. Widholm, Properties and uses of photoautotrophic plant cell cultures, in: K.W. Jeon, M. Friedlander (Eds.), *International review of cytology. A survey of cell biology*, Academic Press, San Diego, 1992, pp. 109-175.
- [26] J. Joyard, E. Teyssier, C. Miège, D. Berny-Seigneurin, E. Maréchal, M.A. Block, A-J. Dorne, N. Rolland, G. Ajlani, R. Douce, The biochemical machinery of plastid envelope membranes, *Plant Physiol.* 118 (1998) 715-723.
- [27] H. Hayashi, Alia, L. Mustardy, P. Deshniem, M. Ida, N. Murata, Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxydase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress, *Plant J.* 12 (1997) 133-142.
- [28] A. Sakamoto, N. Murata, Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycinebetaine and tolerance to salt and cold, *Plant Mol. Biol.* 38 (1988) 1011-1019.
- [29] S.P. Robinson, G.P. Jones, Accumulation of glycinebetaine in chloroplasts provides osmotic adjustment during salt stress, *Aust. J. Plant Physiol.* 13 (1986) 659-668.
- [30] D. Rhodes, A.D. Hanson, Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants, *Annu. Rev. Plant Phys.* 44 (1993) 357-384.

- [31] M. Sartori, A. Nesci, N. Magan, M. Etcheverry, Accumulation of the betaine and ectoine in osmotic stress adaptation of biocontrol agents against *Fusarium verticillioides* in maize, *Agr. Sci.* 3 (2012) 83-89.
- [32] D. Rhodes, P.J. Rich, A.C. Myers, C.C. Reuter, G.C. Jamieson, Determination of betaines by fast atom bombardment mass spectrometry, *Plant Physiol.* 84 (1987) 781-788.
- [33] C. Lerma, P.J. Rich, G.C. Ju, W-J. Yang, A.D. Hanson, D. Rhodes, Betaine deficiency in maize, *Plant Physiol.* 95 (1991) 1113-1119.
- [34] C.M. Grieve, S.R. Grattan, Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds, *Plant Soil* 70 (1983) 303-307.
- [35] D.K. Stumpf, Quantitation and purification of quaternary ammonium compounds from halophyte tissue, *Plant Physiol.* 75 (1984) 273-274.
- [36] K. Arakawa, M. Katayama, T. Takabe, Levels of betaine and betaine aldehyde dehydrogenase activity in the green leaves, and etiolated leaves and roots of barley, *Plant Cell Physiol.* 31 (1990) 797-803.
- [37] G.A. Aguado-Santacruz, J.L. Cabrera-Ponce, E. Ramírez-Chavez, Q. Rascón-Cruz, L. Herrera-Estrella, V. Olalde-Portugal, Establishment, characterization and plant regeneration from highly chlorophyllous embryogenic cell cultures of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag ex. Steud, *Plant Cell Rep.* 20 (2001) 131-136.
- [38] T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plantarum* 15 (1962) 473-497.

CAPÍTULO III

ACUMULACIÓN DE SOLUTOS COMPATIBLES Y ADAPTACIÓN AL ESTRÉS OSMÓTICO DE CÉLULAS CLOROFÍLICAS DE *Bouteloua gracilis*

RESUMEN

Es de gran importancia conocer los mecanismos fisiológicos y bioquímicos de las plantas que les permiten tolerar los factores abióticos adversos para poder inferir su respuesta vegetal a dichos factores. El pasto *Bouteloua gracilis* es una planta altamente tolerante a la sequía, que tiene la capacidad de acumular solutos compatibles en respuesta al déficit hídrico. Los solutos compatibles son compuestos de bajo peso molecular que al aumentar su concentración dentro de la célula no interfieren con las funciones metabólicas normales de ésta. Estos solutos les permiten a las plantas mantener la turgencia, protegen la estructura de las proteínas y proveen protección contra el daño oxidativo. En el presente trabajo, se realizaron cinéticas de crecimiento provenientes de células clorofílicas de *B. gracilis* las cuales fueron expuestas a choque osmótico con 14 y 21% de PEG y se les determinó diferentes variables fisiológicas y bioquímicas a los 0, 3, 6, 9 y 12 días. Los tratamientos de 14 y 21% de PEG mostraron una mayor concentración en fructuosa, trehalosa, glucosa, prolina, glicina betaína, así como en concentración de clorofila con respecto a las células control. El tratamiento de 21% de PEG tuvo las concentraciones más altas de osmolitos. La trehalosa aumento 11 veces mas en las células con 21% de PEG (378.4 ng mg⁻¹ de PS) con respecto a las células control (35.17 ng mg⁻¹ de PS) y en este mismo tratamiento se observo ajuste osmótico en los días 3 y 9 de muestreo de las células clorofílicas. Estos resultados permiten visualizar algunos aspectos de la respuesta vegetal que esta gramínea presenta para tolerar condiciones adversas.

Palabras clave: Cultivos celulares, osmolitos, estrés hídrico, factores abióticos, gramíneas.

COMPATIBLE SOLUTES ACCUMULATION AND ADAPTATION TO OSMOTIC STRESS OF CHLOROPHYLLIC CELLS OF *Bouteloua gracilis*

SUMMARY

It is important to know the physiological and biochemical mechanisms of plants that allow them to tolerate adverse abiotic factors and be able to infer their response to those factors. The grass *Bouteloua gracilis* is a highly drought tolerant plant that has the ability to accumulate compatible solutes in response to water deficit. Compatible solutes are low molecular weight compounds and their increase in concentration within the cell does not interfere with its normal metabolic functions. These solutes allow plants to maintain turgor, protect the structure of proteins and provide protection against oxidative damage. In this study, growth kinetics of chlorophyllic cells from *B. gracilis* were performed. Cells were exposed to osmotic shock with 14 and 21% PEG and different physiological and biochemical traits were measured at 0, 3, 6, 9 and 12 days. Treatments of 14 and 21% PEG showed higher concentration of fructose, trehalose, glucose, proline, glycine betaine and chlorophyll in relation to control cells. Treatment 21% PEG showed higher concentrations of osmolytes. Trehalose increased 11-fold with 21% PEG (378.4 ng mg^{-1} of dry weight) in relation to control cells (35.17 ng mg^{-1} of dry weight) and osmotic adjustment was observed in this treatment at days 3 and 9 of chlorophyllic cells sampling. These results allow an overview of some aspects of response of this grass to tolerate adverse conditions.

Key words: Cell cultures, osmolytes, water stress, abiotic factors, grasses.

INTRODUCCIÓN

El estrés abiótico causado por factores como la salinidad, sequía, temperaturas extremas o el estrés oxidativo representa un problema serio en la agricultura, que puede tener como consecuencia una disminución en el desarrollo y productividad de las plantas. La sequía y la salinidad promueven en la planta una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que pueden generarle daños [1].

En respuesta al estrés hídrico las plantas han desarrollado mecanismos que les han permitido mantener el potencial de turgencia dentro de la célula y la retención de agua en respuesta a la deshidratación, con lo cual se disminuye el daño a la misma [1]. Estos mecanismos de ajuste osmótico se han observado en algunos pastos tolerantes a estrés, donde ocurren diversos procesos, tales como la acumulación de solutos compatibles como la glicina betaína, prolina, azúcares (e.g., sucrosa, fructanos) o polioles (e.g., manitol), además de una disminución de la concentración de iones tóxicos en el citoplasma mediante la restricción de ingreso de Na^+ a la célula. Estos solutos, además de mantener la turgencia, también conservan la integridad de la membrana y la estructura de las proteínas, además de que proveen protección contra el daño oxidativo [2].

La contribución de la glicina betaína al ajuste osmótico ya ha sido confirmada por diversas investigaciones, pero el papel de la acumulación de prolina en el ajuste osmótico aún es debatido y varía de acuerdo con la especie. La acumulación de prolina ocurre cuando se expone la planta a diversos estreses como salinidad [3], sequía, radiación UV [4], iones de

metales pesados [5] o estrés oxidativo [6]. Experimentos donde se transfirieron células hacia medios con un bajo potencial osmótico, mostraron acumulación rápida de prolina. Aunque al inicio de la acumulación de este aminoácido, la turgencia de la planta disminuyó, conforme sigue aumentando la cantidad de prolina la turgencia se normalizó ajustando la presión osmótica. Algunos autores mencionan que el aumento de prolina en condiciones de estrés puede ser de hasta 100 veces [7, 8].

Otro soluto de gran importancia es la trehalosa, un disacárido no reducido de glucosa que funciona como protector en la estabilización de estructuras biológicas y en el aumento en la tolerancia de algunos organismos al estrés abiótico. Investigaciones han demostrado que existe un aumento de este disacárido en las plantas de resurrección como *Selaginella lepidophylla* [9]. Se han transformado plantas mediante la introducción de genes relacionados con la síntesis de trehalosa sintasa, lográndose aumentar la tolerancia a estrés abiótico en tabaco [10]; se observó en las plantas transformadas un mayor contenido de agua, y realizaron más eficazmente el proceso de fotosíntesis.

Las concentraciones de sacarosa, fructosa y almidón también se modifican cuando el potencial de agua se reduce, ya que la actividad de la fructosa-1,6-bifosfatasa y sacarosa-6-fosfato sintasa disminuyen [11]. Para contrarrestar este efecto la planta puede activar genes como *Myb4* que incrementan la acumulación de solutos como glucosa, fructosa, sacarosa, prolina y glicina betaína [12]. La relación alterada de almidón/sacarosa eventualmente causa un cambio en el flujo de Pi en las membranas de cloroplasto, lo cual modifica la síntesis de ATP [13].

El pasto *Bouteloua gracilis* es una planta C₄ altamente tolerante a la sequía, que tiene la capacidad de acumular solutos compatibles en respuesta al déficit hídrico y por tanto es un modelo muy importante para el estudio de los mecanismos celulares que le permiten tolerar o resistir condiciones de agobio hídrico.

Con base en los antecedentes anteriores, el objetivo del presente trabajo fue estudiar la concentración de osmolitos compatibles como prolina, glicina betaína y algunos azúcares (glucosa, sacarosa, fructuosa, trehalosa y almidón) relacionados con ajuste osmótico y tolerancia a la sequía de *Bouteloua gracilis* en las células clorofílicas bajo simulación de sequía utilizando PEG.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cinéticas de crecimiento de suspensiones celulares clorofílicas

Células clorofílicas de *Bouteloua gracilis* se mantuvieron cultivadas en matraces de 125 mL con 25 mL de medio MPC líquido en condiciones óptimas para su crecimiento [14]: luz continua, $77 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$; temperatura $33 \pm 1^\circ\text{C}$ y agitación a 90 rpm. El medio MPC contenía las sales basales y vitaminas de Murashige y Skoog [15], 2 mg L^{-1} de 6-bencilaminopurina (BAP), 1 mg L^{-1} de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 40 mg L^{-1} de adenina y 3% (p/v) de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5.8 antes de la esterilización en una autoclave a 120°C durante 15 min.

Las cinéticas de crecimiento se evaluaron mediante el cultivo de células clorofílicas en condiciones óptimas o hiperosmóticas. El tratamiento osmótico se realizó adicionando polietilenglicol (PEG) 8000 al medio MPC en concentraciones de 14 o 21%. Se utilizó un cultivo celular inicial de 8-días para inocular 0.4 g de células (peso fresco) en matraces de 125 mL que contenían 25 mL de medio MPC líquido. Las células provenientes del cultivo inicial (células de 8 días) fueron consideradas como el material del día 0 en las cinéticas de crecimiento. Todas las células de las cinéticas se mantuvieron en las condiciones ambientales descritas anteriormente. Para la determinación de las variables fisiológicas y bioquímicas se realizaron muestreos en el día 0, y también 3, 6, 9 y 12 días después de realizar la inoculación de las células en los 120 matraces (10 repeticiones por tratamiento).

Determinación de variables fisiológicas y bioquímicas en las células clorofílicas

En cada muestreo realizado (0, 3, 6, 9 y 12 días), se evaluaron las siguientes variables fisiológicas y bioquímicas: peso fresco (PF), peso seco (PS), potencial osmótico (Ψ_{π}), potencial hídrico (Ψ_w), potencial de turgencia (Ψ_T), concentraciones de clorofila, prolina, glicina betaína, sacarosa, fructuosa, glucosa, trehalosa y almidón.

Determinación de PF y PS: se utilizó un sistema de filtración para separar la biomasa celular del medio líquido; después de eliminar el exceso de medio con una toalla de papel, se determinó el PF. Las muestras obtenidas a los 0, 3, 6, 9 y 12 días de todos los tratamientos fueron secadas en una estufa a 60°C durante 48 h para la obtención del PS.

Determinación de potenciales: para la determinación del Ψ_w y Ψ_π se utilizó un microvoltímetro de punto de rocío (Wescor HR-33T, Inc., Utah, EE.UU.) y los valores se compararon contra una curva de calibración previamente elaborada con concentraciones conocidas de NaCl. Las células fueron separadas del medio líquido mediante un sistema de filtración, y fueron lavadas tres veces con agua destilada para eliminar restos de PEG. Posteriormente, estas células se colocaron en cámaras psicrométricas de termopar C-52 (Wescor, Inc., Utah, EE.UU) y después de lograr el punto de equilibrio (dos horas aproximadamente) se determinó el Ψ_w . Para la determinación del Ψ_π se utilizó el mismo procedimiento que para el Ψ_w pero a fin de eliminar la turgencia, las células fueron congeladas con nitrógeno líquido antes de colocarlas en las cámaras psicrométricas. El Ψ_T se calculó obteniendo la diferencia entre Ψ_w y Ψ_π .

Determinación de clorofila, prolina y glicina betaína (GB): la clorofila fue extraída de las células con acetona 80% (v/v) y su concentración se midió espectrofotométricamente siguiendo el protocolo de Arnon [16]. Las concentraciones de prolina fueron determinadas por el método de Bates [17], haciendo uso de una curva de calibración con L-prolina (Sigma-Aldrich). La determinación de glicina betaína se realizó mediante una técnica modificada de Grieve y Grattan [18].

Determinación de azúcares (sacarosa, fructuosa, glucosa, trehalosa) y almidón: para la determinación de sacarosa, fructuosa, glucosa y almidón, se utilizó un método de enzimas acopladas descrito por Baud *et al.* [19]. El análisis cuantitativo de trehalosa se llevó a cabo mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La integración de los picos se

realizó mediante el software Agilent Chemstation (Agilent Technologies). Para el análisis por HPLC se pesaron 10 mg de células liofilizadas y se les agregó 500 μ L de agua destilada. Posteriormente, las muestras se calentaron a 80°C durante 10 min y se centrifugaron por 10 min a 10,000 rpm. Finalmente, se recolectó el sobrenadante y se transfirió a viales de HPLC. Previamente se realizó la curva de calibración utilizando el aminoácido trehalosa (Sigma-Aldrich).

Diseño experimental

Se realizaron 4 réplicas de la cinética de crecimiento completa, la cual incluyó 120 matraces; tratamientos de 14 y 21% de PEG, y tratamiento control (células clorofílicas mantenidas en condiciones óptimas para su crecimiento). La información fue analizada mediante análisis de varianza aplicando un diseño completamente al azar, y las medias fueron comparadas mediante la prueba de diferencia mínima significativa ($P \leq 0.05$; [20]).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Peso fresco y seco

El incremento en PF observado en las cinéticas de crecimiento fue disminuyendo notablemente a partir del día 6 (Figura 1A) en los tratamientos con estrés osmótico. Las células crecidas en 21% PEG fueron las que obtuvieron el menor PF en todos los días de muestreo (excepto el día 0). Por lo tanto, el PF de las suspensiones celulares disminuyó a medida de que decreció el Ψ_{π} de las células. El comportamiento de las suspensiones celulares

es similar al obtenido por otros autores [21], donde la línea celular clorofílica de *B. gracilis* 'TADH-XO' disminuyó su PF a partir del sexto día en presencia de 7% y 14% de PEG.

Con respecto al PS no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos con PEG y el control (Figura 1B). Estos resultados coinciden con los presentados previamente por otros autores [22], que estudiaron materiales tolerantes y susceptibles de frijol en condiciones de estrés hídrico (estrés moderado, 40% de capacidad de campo (CC); estrés severo, 20% CC) observando una mayor estabilidad de PS en los genotipos tolerantes en condiciones de estrés hídrico con respecto al tratamiento control (riego normal).

Potencial hídrico, osmótico y de turgencia

El Ψ_w de las células clorofílicas del tratamiento control fue mayor en todos los puntos del muestreo con respecto a las células que fueron sometidas a los tratamientos de estrés osmótico. En la Figura 2A se observan dos puntos de caída del Ψ_w los cuales corresponden a los días 3 y 9 de muestreo, siendo más notorio en el tratamiento con 21% PEG. A mayor estrés osmótico aplicado en los tratamientos, mayor fue la disminución del Ψ_w .

Las células tratadas con 14 y 21% PEG mostraron un menor potencial osmótico a partir del día 3 con respecto al control (Figura 2B), observando la misma tendencia que en el Ψ_w . En los días 3 y 9 de muestreo se registró una mayor caída del Ψ_π . El Ψ_π fue inversamente proporcional a los niveles de PEG empleados en los tratamientos de estrés osmótico.

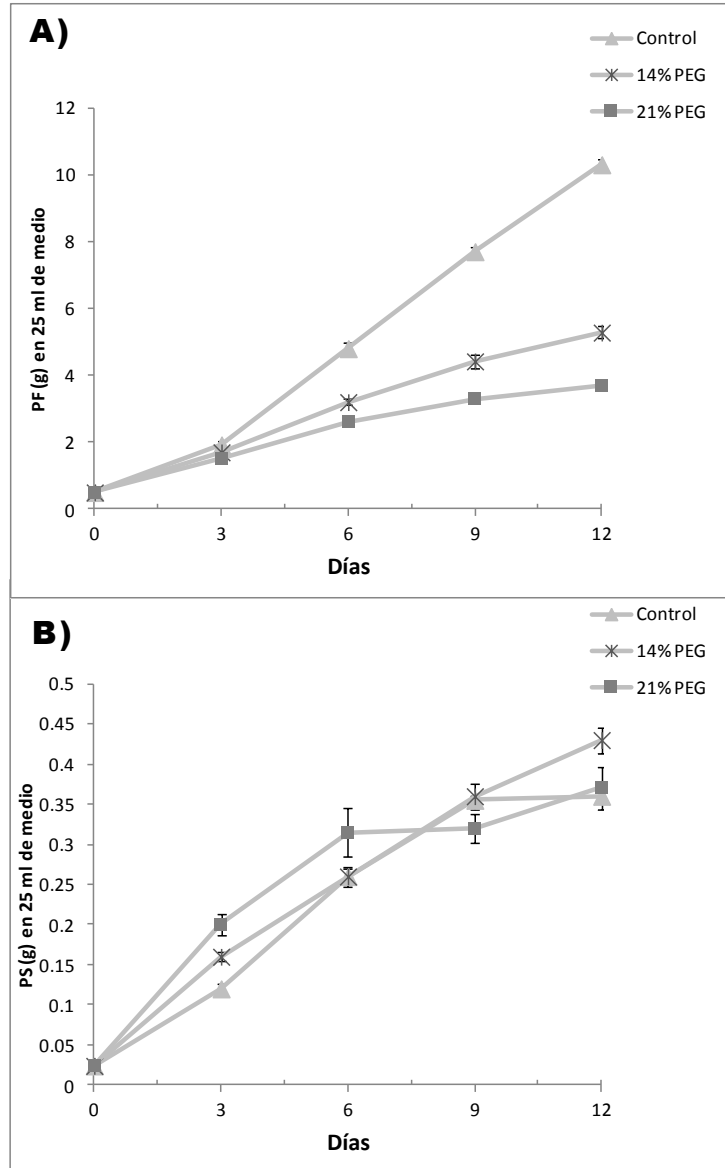


Figura 1. Peso fresco y seco de células clorofílicas de *B. gracilis* bajo tratamientos de estrés osmótico. Los valores son la media de 10 repeticiones de 4 experimentos independientes. Las barras representan \pm el error estándar.

La Figura 2C muestra el ajuste osmótico que existió en el tratamiento con 21% PEG en los días 3 y 9 de muestreo de las células clorofílicas, debido a que el Ψ_T en estos muestreos no fue estadísticamente diferente con respecto al control. En el día 3 también se observó el mismo Ψ_T en las células con tratamiento de 14% PEG con respecto a las células control. Esto sugiere que la notable reducción del Ψ_π en los días 3 y 9, debido al aumento de osmolitos,

mantuvo el potencial de turgencia de las células. Es muy importante para las plantas mantener la presión de turgencia aún bajo condiciones de estrés hídrico, por ello, las células clorofílicas estudiadas en el presente trabajo serían de gran importancia para realizar la búsqueda de genes que confieran tolerancia al estrés osmótico.

Clorofila

La concentración de clorofila total observada en las células de los tratamientos con 14 y 21% de PEG fueron mayores en todas las fechas de muestreo con respecto a la de las células control (Figura 3). En el día 3 de muestreo se observó una gran disminución del contenido de clorofila en todos los tratamientos y en las células control, lo cual coincide con los resultados presentados previamente por otros autores [21] que estudiaron células clorofílicas de *B. gracilis* en tratamientos de estrés osmótico utilizando diferentes concentraciones de PEG y mencionaron que estos resultados son debidos al efecto inhibitorio de los carbohidratos en la síntesis de clorofila y en la fotosíntesis.

En el día 6 se observó la máxima acumulación de clorofila en el tratamiento de 14% (526 $\mu\text{g g}^{-1}$ de PF) y en el día 9 en las células con 21% PEG (679 $\mu\text{g g}^{-1}$ de PF).

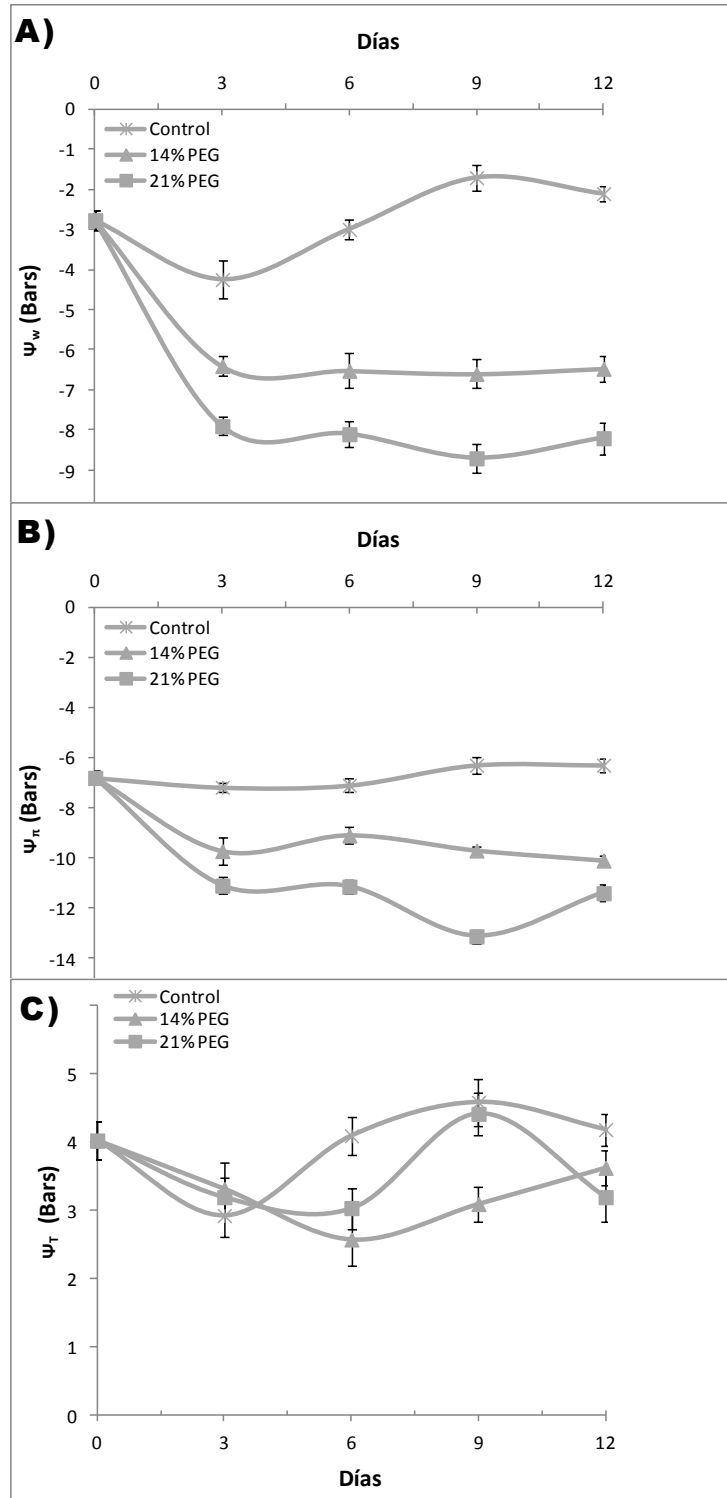


Figura 2. Potencial hídrico, osmótico y de turgencia de las células clorofílicas de *B. gracilis* en los tratamientos de estrés osmótico. Los valores son la media de 10 repeticiones de 4 experimentos independientes. Las barras representan \pm el error estándar.

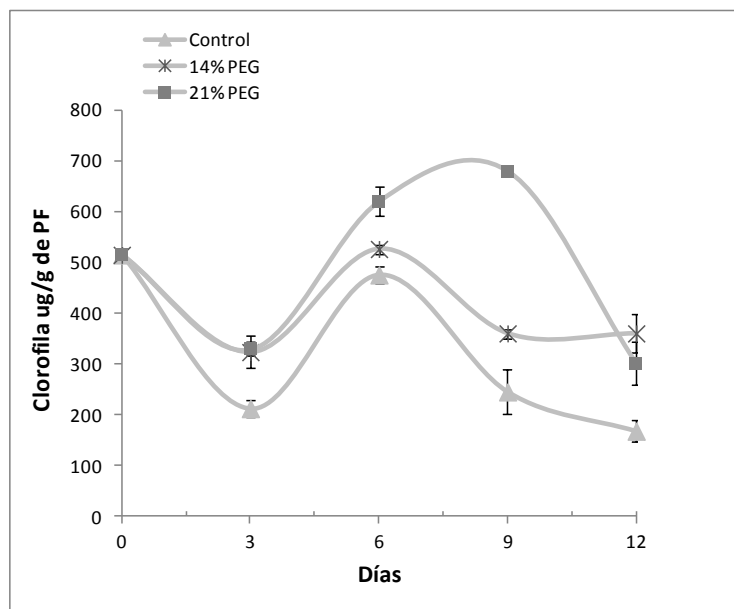


Figura 3. Contenido de clorofila total en células clorofílicas de *B. gracilis* en los tratamientos de estrés osmótico. Los valores son la media de 10 repeticiones de 4 experimentos independientes. Las barras representan \pm el error estándar.

Prolina

Se observó la máxima concentración de prolina al día 3 de crecimiento, en las células clorofílicas que fueron sometidas a los tratamientos de estrés osmótico (Figura 4). Las células control mostraron muy bajas concentraciones de prolina en todos los días de muestreo con respecto a los tratamientos. Lográndose obtener hasta 18.6 μ M de prolina por g de PF en el tratamiento con 21% PEG, lo que representa una concentración 4 veces mayor de este osmolito en las células tratadas con PEG que en las células crecidas en condiciones isosmóticas. Estos resultados son similares a los obtenidos por Herrera *et. al* [23] donde encontraron que la cantidad de prolina en la célula aumentó conforme disminuyó el potencial osmótico.

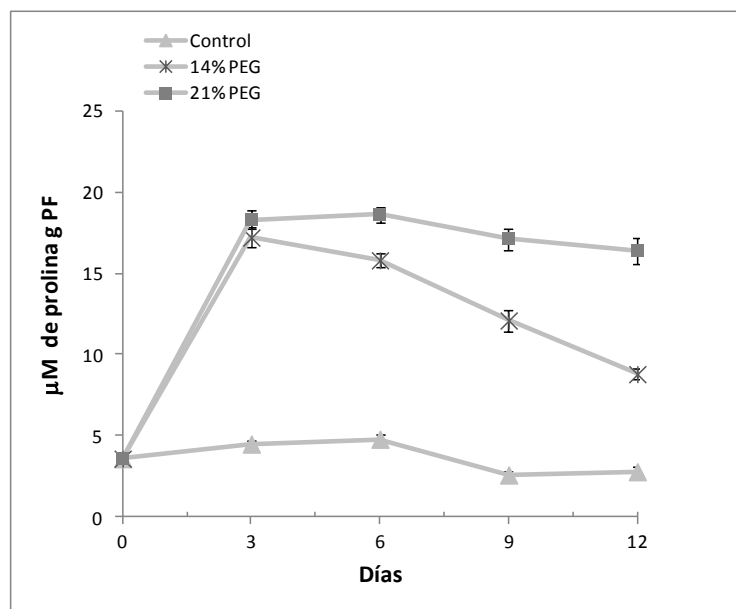


Figura 4. Contenido de prolina en células clorofílicas de *B. gracilis* crecidas en condiciones de estrés osmótico. Los valores son la media de 10 repeticiones de 4 experimentos independientes. Las barras representan \pm el error estándar.

Glicina betaína

Los osmolitos prolina y glicina betaína tuvieron su valor máximo al día 3 de crecimiento, observándose tendencias similares en ambos osmolitos. Las células del tratamiento con 21% PEG mostró la mayor concentración de glicina betaína en todos los puntos de muestreo. En el día 3 de crecimiento se tuvieron concentraciones de 488.73 y 1413.23 $\mu\text{g mg}^{-1}$ PS de glicina betaína en las células control y en las células tratadas con 21% PEG respectivamente, lo que representa una concentración 3 veces mayor de este osmolito en las células tratadas con PEG que en las células control (Figura 5).

Yang y Lu [24] mencionan que la aplicación de GB en plantas de maíz fue benéfico para la conductancia estomática, fotosíntesis, eficiencia en el uso del agua y crecimiento de la planta.

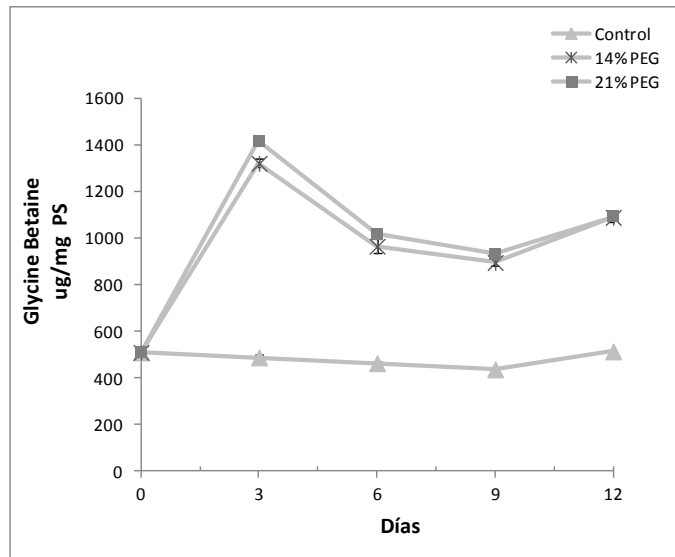


Figura 5. Contenido de glicina betaína en células clorofílicas de *B. gracilis* crecidas en condiciones de estrés osmótico. Los valores son la media de 10 repeticiones de 4 experimentos independientes. Las barras representan \pm el error estándar.

Sacarosa, fructuosa, glucosa y almidón

Las células de los tratamientos de 14 y 21% PEG mostraron una mayor concentración en fructuosa y glucosa en los días 3, 6 y 9 de crecimiento con respecto a las células control (Figuras 6B y 6C), observándose el máximo valor al día 9 de las cinéticas de crecimiento. Esto concuerda con lo reportado para otras especies, como en plantas de frijol bajo condiciones de estrés [23]. En el caso del almidón, se observó un comportamiento inverso (Figura 7), con mayores concentraciones de este polisacárido en las células control con respecto a los tratamientos de estrés osmótico, lo que sugiere que el almidón podría ser destinado a rutas metabólicas relacionadas con la síntesis de azúcares cuando se encuentran las plantas bajo algún estrés con la finalidad de poder resistir los daños ocasionados por dicho estrés. Con respecto a la sacarosa, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de este azúcar en las células clorofílicas sometidas a estrés osmótico con respecto a las células control (Figura 6A).

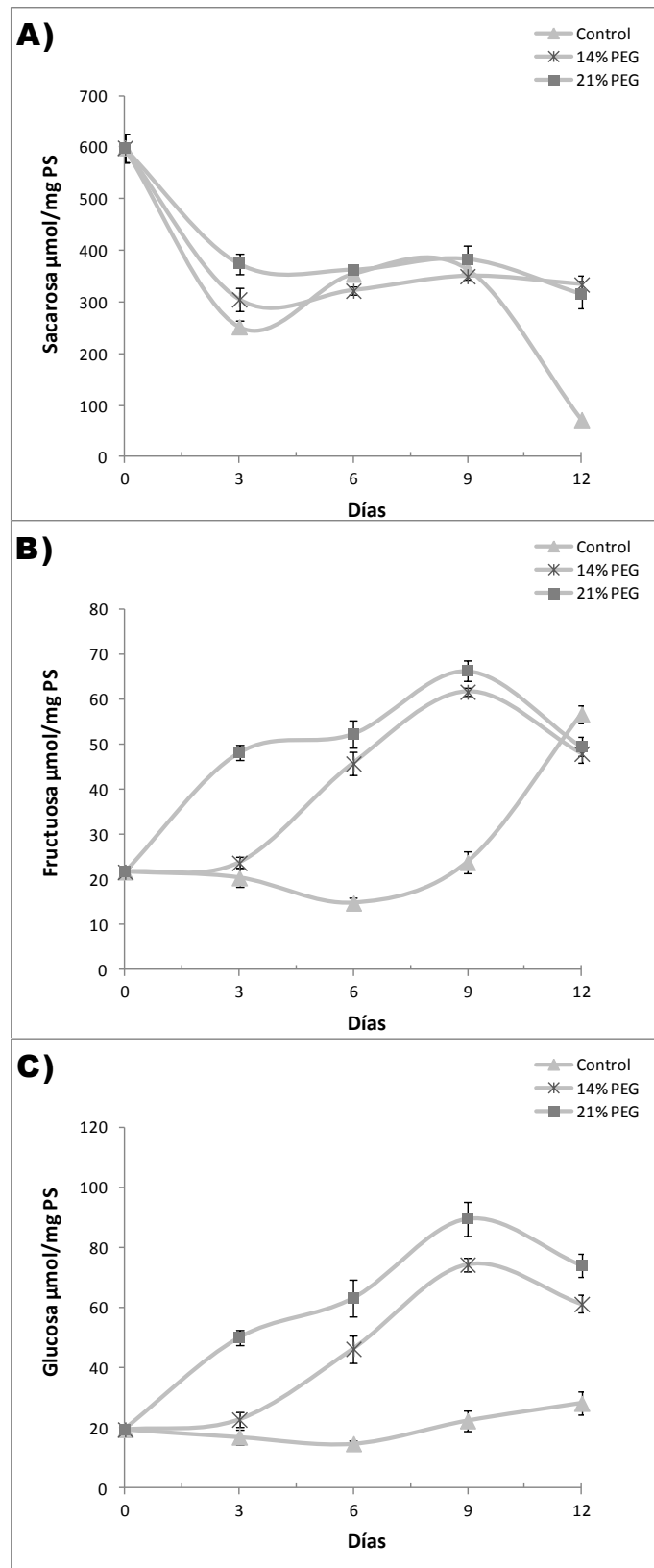


Figura 6. Contenido de sacarosa, fructuosa y glucosa en células clorofílicas de *B. gracilis* crecidas en condiciones de estrés osmótico. Los valores son la media de 10 repeticiones de 4 experimentos independientes. Las barras representan \pm el error estándar.

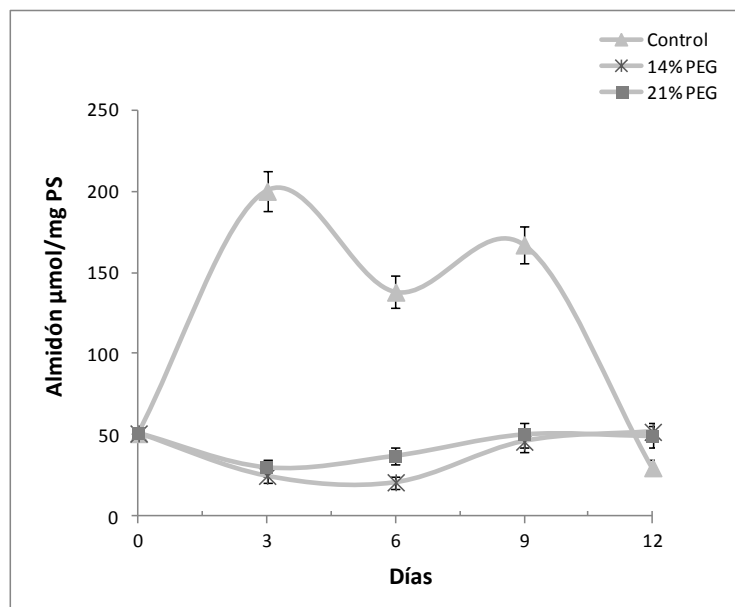


Figura 7. Contenido de almidón en células clorofílicas de *B. gracilis* crecidas en condiciones de estrés osmótico. Los valores son la media de 10 repeticiones de 4 experimentos independientes. Las barras representan \pm el error estándar.

Trehalosa

La concentración de trehalosa en las células de los tratamientos con PEG fue mucho mayor en todos los puntos de muestreo con respecto a las células control (Figura 8). Las células clorofílicas tratadas con 14 y 21% de PEG mostraron los máximos valores en el día 6. La concentración de este osmolito en las células control y en el tratamiento con 21% de PEG fue de 35.17 y 378.4 ng mg⁻¹ de PS respectivamente, lo que representa 11 veces más la concentración de trehalosa en las células crecidas con PEG con respecto a las células control.

Considerando todos los resultados anteriores obtenidos en este estudio, se pudo constatar que la trehalosa fue el osmolito que mostró mayor incremento en las células clorofílicas que fueron sometidas a los tratamientos con PEG. La acumulación de trehalosa se

ha reportado en plantas con una gran tolerancia a la sequía como *Selaginella lephidophyla*, donde el aumento de trehalosa es hasta de 24 mg por g de PS en un tiempo de 24 h [25].

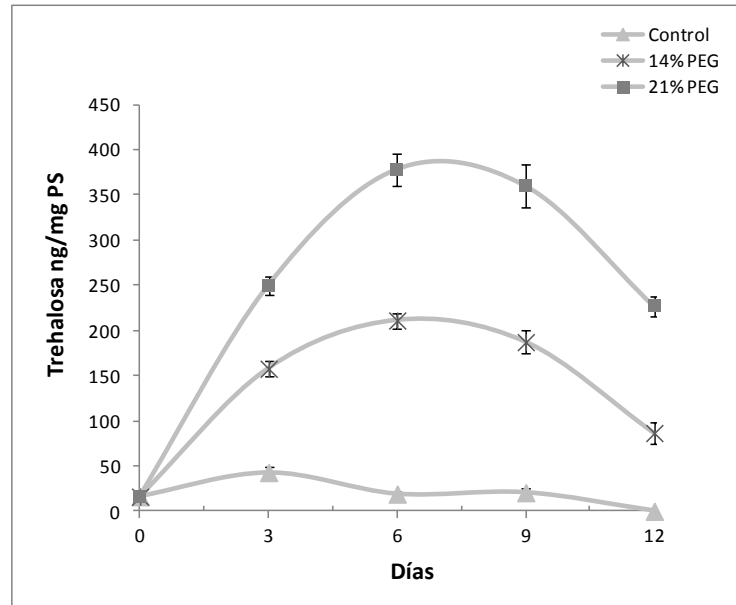


Figura 8. Contenido de trehalosa en las células clorofílicas de *B. gracilis* crecidas en condiciones de estrés osmótico. Los valores son la media de 10 repeticiones de 4 experimentos independientes. Las barras representan \pm el error estándar.

CONCLUSIONES

En los tratamientos de estrés osmótico (14 y 21% PEG) se obtuvieron mayores concentraciones de importantes osmolitos tales como fructuosa, trehalosa, glucosa, prolina, glicina betaína, y también mostraron mayores concentraciones de clorofila con respecto a las células control. Las células expuestas a 21% de PEG mostraron los valores más altos de los osmolitos fructuosa, trehalosa, glucosa, prolina y glicina betaína, observándose ajuste osmótico en los días 3 y 9 de crecimiento. La trehalosa fue el osmolito que registró mayores incrementos, debido a que se obtuvo 11 veces más su concentración en las células con tratamiento osmótico de 21% PEG con respecto a las células control. Estos resultados proporcionan información importante para desarrollar estudios biotecnológicos que permitan

el aislamiento e identificación de genes relacionados con la resistencia a factores abióticos en esta importante especie.

REFERENCIAS

- [1] C. Ghoulam, A. Foursy, K. Fares, Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars, *Environ. Exp. Bot.* 47 (2002) 39-50.
- [2] F.A. Hoekstra, E.A. Golovina, J. Buitink, Mechanisms of plant desiccation tolerance, *Trends Plant Sci.* 6 (2001) 431-438.
- [3] Y. Yoshiba, T. Kiyosue, T. Katagiri, H. Ueda, T. Mizoguchi, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Wada, Y. Harada, K. Shinozaki, Correlation between the induction of a gene for Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress, *Plant J.* 7 (1995) 751-760.
- [4] P. Saradhi, Alia, S. Arora, K.V.S.K. Prasad, Proline accumulates in plants exposed to UV radiation and protects them against UV induced peroxidation, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 209 (1995) 1-5.
- [5] C.T. Chen, L.-M. Chen, C.C. Lin, C.H. Kao, Regulation of proline accumulation in detached rice leaves exposed to excess copper, *Plant Sci.* 160 (2001) 283-290.
- [6] S.-L. Yang, S.-S. Lan, M. Gong, Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings, *J. Plant Physiol.* 166 (2009) 1694-1699.
- [7] S. Handa, A.K. Handa, P.M. Hasegawa, R.A. Bressan, Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress, *Plant Physiol.* 80 (1985) 938-945.
- [8] N. Verbruggen, C. Hermans, Proline accumulation in plants: a review, *Amino Acids* 35 (2008) 753-759.

- [9] S. Pampurova, K. Verschooten, N. Avonce, P. Van Dijck, Functional screening of a cDNA library from the desiccation-tolerant plant *Selaginella lepidophylla* in yeast mutants identifies trehalose biosynthesis genes of plant and microbial origin, *J. Plant Res.* 127 (2014) 803-813.
- [10] S.-Z. Zhang, B.-P. Yang, C.-L. Feng, H.-L. Tang, Genetic transformation of tobacco with the trehalose synthase gene from *Grifola frondosa* Fr. enhances the resistance to drought and salt in tobacco, *J. Integr. Plant Biol.* 47 (2005) 579-587.
- [11] S. Haupt-Herting, H.P. Fock, Oxygen exchange in relation to carbon assimilation in water-stressed leaves during photosynthesis, *Ann. Bot.* 89 (2002) 851–859.
- [12] M. Mattana, E. Biazzi, R. Consonni, F. Locatelli, C. Vannini, S. Provera, I. Coraggio, Overexpression of *Osmyb4* enhances compatible solute accumulation and increases stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*, *Physiol. Plantarum* 125 (2005) 212-223.
- [13] W. Tezara, V.J. Mitchell, S.D. Driscoll, D.W. Lawlor, Water stress inhibits plant photosynthesis by decreasing coupling factor and ATP, *Nature* 1401 (1999) 914-917.
- [14] G.A. Aguado-Santacruz, J.L. Cabrera-Ponce, E. Ramírez-Chavez, C.G. León-Ramírez, Q. Rascón-Cruz, L. Herrera-Estrella, V. Olalde-Portugal, Establishment, characterization and plant regeneration from highly chlorophyllous embryogenic cell cultures of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.). Lag ex. Steud., *Plant Cell Rep.* 20 (2001) 131-136.
- [15] T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plantarum* 15 (1962) 473-497.
- [16] D.I. Arnon, Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiol.* 24 (1949) 1-15.
- [17] L.S. Bates, R.P. Waldren, I.D. Teare, Rapid determination of free proline for water-stress studies, *Plant and Soil* 39 (1973) 205-207.

- [18] C.M. Grieve, S.R. Grattan, Rapid assay for determination of water soluble quaternary ammonium compounds, *Plant and Soil* 70 (1983) 303-307.
- [19] S. Baud, J.-P. Boutin, M. Miquel, L. Lepiniec, C. Rochat, An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS, *Plant Physiol. Biochem.* 40 (2002) 151-160.
- [20] R.G.D. Steel, J.H. Torrie, *Bioestadística: Principios y Procedimientos*, McGraw-Hill, México, D.F. 1992.
- [21] X. García-Valenzuela, E. García-Moya, Q. Rascón-Cruz, L. Herrera-Estrella, G.A. Aguado-Santacruz, Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyll cells, *J. Plant Physiol.* 162(2005) 650-661.
- [22] S. Alemán, A. Domínguez, D. Domínguez, L. Fuentes, K. Miranda, Y. Pérez, B. Pernía, D. Sosa, M. Sosa, D. Infante, Estudio anatómico y bioquímico en materiales cubanos y venezolanos de *Phaseolus vulgaris* L. bajo condiciones de estrés hídrico, *RET. Revista de Estudios Transdisciplinarios* 2 (2010) 89-99.
- [23] T.S. Herrera F., J. Ortiz C., A. Delgado A., J.A. Acosta G., Crecimiento y contenido de prolina y carbohidratos de plántulas de frijol sometidas a estrés por sequía, *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 3 (2012) 713-725.
- [24] X. Yang, C. Lu, Photosynthesis is improved by exogenous glycinebetaine in salt-stressed maize plants, *Physiol. Plantarum* 124(2005) 343-352.
- [25] C.G. Figueroa-Soto, G. Iturriaga, E.M. Valenzuela-Soto, Actividad de trehalosa 6-fosfato sintasa en plantas de *Selaginella lepidophylla* en respuesta a hidratación y desecación, *Rev. Fitotec. Mex.* 27 (2004) 17-22.

CAPÍTULO IV

CONSTRUCCIÓN DE BIBLIOTECAS DE cDNA PARA BÚSQUEDA DE GENES DE RESISTENCIA A SEQUÍA EN *Bouteloua gracilis*

RESUMEN

Las bibliotecas de cDNA son una herramienta poderosa para identificar genes con funciones específicas. *Bouteloua gracilis* es un pasto altamente tolerante al déficit hídrico, que tiene la capacidad de acumular solutos compatibles en respuesta a factores adversos abióticos, por lo tanto, es un importante modelo para estudios de expresión genética. Actualmente, se cuenta con una línea celular clorofílica de esta gramínea, única en su tipo. Esta línea acumula altas concentraciones de clorofila y de osmolitos en tratamientos de estrés osmótico, y es tolerante a altas concentraciones de polietilenglicol (PEG). Se construyeron bibliotecas de cDNA provenientes de células clorofílicas del pasto *B. gracilis* sometidas a tratamientos de choque osmótico con 14 y 21% de PEG. Las bibliotecas se generaron a partir de las células del día 6 de crecimiento. Se obtuvo un total de 335 clonas putativas positivas al realizar la hibridación con 10 sondas diferentes. El 10% de las clonas putativas presentaron un inserto después de realizar las amplificaciones mediante PCR utilizando los primer universales M13F/M13R. Los resultados de la secuenciación de las clonas mostraron que la clona 13, hibridada con la sonda superóxido dismutasa (SOD) tuvo una similitud del 98% con el gen que codifica para la proteína *WOX5A* involucrada en la diferenciación celular y el metabolismo secundario en *Zea mays*, un 98% de similitud con proteínas acuaporinas PIP (*HvPIP2*) de *Hordeum vulgare* y un 75% con lncRNA de respuesta a estrés hídrico en *Zea mays*.

Palabras clave: Estrés hídrico, gramíneas, superóxido dismutasa.

**CONSTRUCTION OF cDNA LIBRARIES FOR SEARCHING DROUGHT
RESISTANCE GENES IN *Bouteloua gracilis***

SUMMARY

cDNA libraries are a powerful tool to identify genes with specific functions. *Bouteloua gracilis* is a grass highly tolerant to water deficit, with the ability to accumulate compatible solutes in response to abiotic stresses; therefore, it is an important model for gene expression studies. Currently, a unique-type chlorophyllic cellular line of this grass has been developed. This line accumulates high concentrations of chlorophyll and osmolytes under osmotic stress treatments, and it is tolerant to high concentrations of polyethylene glycol (PEG). cDNA libraries were constructed from chlorophyllic cells of *B. gracilis* subjected to osmotic shock treatments with 14 and 21% PEG. Libraries were generated from cells at the sixth day of growing. A total of 335 positive putative clones were obtained through hybridization with 10 different probes. Ten percent of putative clones had an insert after performing PCR amplifications using M13F/M13R universal primers. Results of the sequencing of clones showed that Clone 13, hybridized with the superoxide dismutase (SOD) probe, had 98% similarity with the gene encoding the *WOX5A* protein involved in cell differentiation and secondary metabolism in *Zea mays*, 98% similarity to PIP aquaporins (*HvPIP2*) of *Hordeum vulgare* and 75% similarity to *IncRNA*, related to water stress response in *Zea mays*.

Key words: Water stress, grasses, superoxide dismutase.

INTRODUCCIÓN

Los marcadores de secuencia expresada (ESTs) representan una manera rápida e informativa de estudiar el perfil de expresión de algunos genes bajo ciertas condiciones de desarrollo o ambientales específicas. La construcción de bibliotecas de cDNA ha sido la estrategia para el estudio de estos perfiles intentando encontrar una correlación entre los genes transcritos y los niveles de fotosíntesis bajo condiciones de estrés, observándose diferencias en el número, tipo y niveles de expresión de ciertos genes [1].

Algunas plantas tolerantes al estrés abiótico tienen gran capacidad para modular de manera rápida la expresión de algunos genes bajo estas condiciones. Blair y colaboradores [2] construyeron dos bibliotecas de cDNA de frijol, una bajo condiciones de sequía y la otra en condiciones de suelo ácido, identificando un total de 4219 genes. Un trabajo similar se realizó en la planta *Ammopiptanthus mongolicus*, que presenta una gran tolerancia a la sequía, en el cual se identificaron 531 genes nuevos para la planta al realizar la biblioteca de cDNA, los cuales pudiesen estar relacionados con su tolerancia al déficit hídrico [3]. Existen además otras bibliotecas de cDNA como la construída para *Prosopis juliflora*, en la cual se identificaron genes que específicamente participan en la tolerancia al estrés, como los que codifican para proteínas de choque térmico, metalotioneinas, proteínas de transferencia de lípidos y proteínas de embriogénesis temprana; mediante un análisis tipo Northern se demostró que 21 de estos genes aumentaron su expresión, mientras que 16 de ellos la disminuyeron [4].

La regulación de la expresión de los genes está mediada por proteínas de unión a elementos de respuesta a deshidratación (DREB), los cuales pertenecen a una subfamilia de factores de transcripción AP2/ERF que controlan la expresión de muchos genes inducibles por estas condiciones. En bibliotecas como las de trigo [5], se han encontrado estos elementos de respuesta.

El pasto navajita azul (*Bouteloua gracilis*) es una planta dominante en los pastizales del centro y norte de México (estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Aguascalientes y norte de Jalisco), donde se le considera uno de los pastos nativos con mayor valor forrajero, además de que una vez establecido presenta gran tolerancia a condiciones ambientales extremas. Sin embargo, el problema para su empleo para la rehabilitación de pastizales es su baja tasa de establecimiento mediante semillas, debido a que requiere un periodo de 8 a 10 semanas en presencia de humedad [6]. En células cloroflicas de *Bouteloua gracilis* se construyeron bibliotecas de cDNA empleando una concentración de 14% de polietilenglicol (PEG) en la que se clonaron 261 secuencias cuya función se desconoce en 44% de ellas, pero probablemente alberguen genes responsables de su elevada tolerancia al estrés; las 56% de las secuencias restantes se clasificaron en diferentes categorías, de acuerdo con su función [7].

Además de la generación de bibliotecas de cDNA, también se han elaborado bibliotecas de DNA cloroplastídico. Hasta la fecha se ha realizado un mapeo parcial del plastoma para identificar genes que también puedan estar relacionados con la tolerancia a factores abióticos [8].

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue construir bibliotecas de cDNA a partir de la línea celular clorofílica de *Bouteloua gracilis* sometida a estrés osmótico y aislar e identificar genes involucrados en la respuesta de esta gramínea a estrés hídrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y tratamientos de estrés osmótico

Las células clorofílicas de *Bouteloua gracilis* fueron cultivadas en matraces de 125 mL con 25 mL de medio MPC líquido en condiciones óptimas para su crecimiento [9]: luz continua, $77 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$; temperatura $33 \pm 1^\circ\text{C}$, y agitación a 90 rpm. El medio MPC contenía las sales basales y vitaminas de Murashige y Skoog [10], 2 mg L^{-1} de 6-bencilamino purina (BAP), 1 mg L^{-1} de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 40 mg L^{-1} de adenina y 3% (p/v) de sacarosa. El pH del medio se ajustó a 5.8 antes de la esterilización en una autoclave a 120°C durante 15 min.

El tratamiento osmótico se realizó adicionando polietilenglicol (PEG) 8000 al medio MPC en concentraciones de 14% o 21%. Se utilizó un cultivo celular inicial de 8-días para inocular 0.4 g de células (peso fresco) en matraces de 125 mL que contenían 25 mL de medio MPC líquido con las distintas concentraciones de PEG.

Extracción de RNAt y RNAm

Se realizó la extracción de RNAt en las células clorofíticas cultivadas durante 6 días en 14 y 21% PEG, así como de plantas de *B. gracilis* crecidas en condiciones de invernadero (control). La extracción se realizó mediante el kit RNeasy Plant Mini Kit (Quiagen®). La concentración del ARNt se determinó mediante un biofotómetro (Eppendorf®). El RNAm se aisló y purificó mediante el kit de esferas magnéticas Dynabeads (DynaL, Oslo, Noruega). La calidad del RNAt y RNAm se evaluó en geles de agarosa desnaturalizante al 1.2%.

Construcción de bibliotecas de cDNA

Para la construcción de bibliotecas de cDNA se utilizaron 2 µg de RNAm de las células sometidas a los tratamientos con 14 y 21% de PEG, utilizando el kit CloneMiner™ II cDNA Library Construction Kit (Invitrogen). Se utilizó el vector de clonación pDONR™222, y las células electro competentes ElectroMAX™ DH10B™ incluidas en el kit.

Verificación de la biblioteca

Para la verificación se sembró la bacteria *Escherichia coli* transformada con el vector de clonación pDONR™222 que contenía las secuencias de interés, en cajas con medio Luria Bertani (LB) con 50 µg mL⁻¹ de kanamicina para las bibliotecas de 14%, 21% de PEG, y control de RNA. Para el control de transformación pUC19 se preparó medio LB con 100 µg mL⁻¹ de ampicilina. Posteriormente se incubaron durante toda la noche a 37°C y 250 rpm. Los controles de RNA y de transformación venían incluidos en el kit CloneMiner™ II cDNA Library Construction Kit.

Iniciadores y marcaje de sondas

En el Cuadro 1 se muestra la secuencia de los iniciadores (Sigma-Aldrich) utilizados para realizar la búsqueda de secuencias en las bibliotecas de cDNA de las células clorofíticas. Las sondas fueron marcadas con digoxigenina (DIG) siguiendo el protocolo de Boehringer-Mannheim [11].

Cuadro 1. Iniciadores utilizados para la hibridación en placa de las bibliotecas de cDNA.

Iniciador	Secuencia	Producto (bases)
BADH (Betaína aldehído deshidrogenasa)	F 5' GATGATGGCCTCGCAAGC R 5' TCCAAGCTGTAAACTGGCAA	1361
SOD (Superóxido dismutasa)	F 5' CCTCCCAAAGTCCCAAAGG R 5' TCCATTGTAGGTTGCTCGC	
Holocarboxilasa sintetasa (2_f10)	F 5'GGGCAGGTACCTCAGCATC R 5'TGCAGGTCGACTCTAGAGGAT	602
GTP Ciclohídroxilasa II/3,4-dihydroxy-2-butanona-4-fosfato sintasa (1_h08)	F 5' GGATCCGAATAGCGTGGTCT R 5' TGCAGGTCGACTCTAGAGGAT	581
60S Proteína ribosomal L10A (3_e02)	F 5' TGTCTCGGGTCAAACCCTA R 5' CACTAATAATCAGATGTGGTCATACA	753
Gene hsp13 proteína de choque térmico de la clase II citosólica (1_F10)	F 5' AGGTCGGCTCTGGGTGAG R 5' TGCAGGTCGACTCTAGAGGAT	520
PsLhcA4 PSI (1_e05)	F 5' CCGAGGTACGTCTCCATCTG R 5' GTACCCGATGAGCATGTGAA	625
Pirofosfatasa inorgánica (AVP-3) (1_c01)	F 5'CGGCTCCAACAACGAGTC R 5'ACACCTTCTGCGCCACAT	275
Factor de ADP ribosilación (2_g11)	F 5' AAATGCCGGATCCAAACATA R 5' CCGAGGTCTCGAGGAAGAC	539
(CEBPG) Proteína de unión al amplificador CCAAT gamma (1_f08)	F 5' AACCCCTAAGCACGGAGTTGA R 5'TGCAGGTCGACTCTAGAGGAT	643

Southern blot, hibridación de colonias en placa y secuenciación

Se realizó Southern blot de las bibliotecas de cDNA generadas utilizando la técnica de hibridación de colonias en placa de acuerdo a la metodología de Boehringer-Mannheim [11], y se utilizaron las sondas marcadas con DIG para llevar a cabo la búsqueda de secuencias de interés en las bibliotecas de cDNA mediante el protocolo de hibridación de CIMMYT [12].

Se seleccionaron las clonas putativas positivas, se subcultivaron y aislaron en medio LB fresco con $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ de kanamicina, y se incubaron durante toda la noche a 37°C . Posteriormente, se realizó la extracción de ADN plasmídico utilizando el protocolo tipo Miniprep modificado propuesto por Birnboim y Doly [13]. La concentración de ADN se cuantificó con un espectrofotómetro de ultra bajo volumen NanoDrop Modelo 2000c (Thermo Scientific, USA), y se realizaron diluciones para utilizar 20 ng de ADN en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los primers universales (M13F/MP13R). Los resultados se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%, seleccionando únicamente las clonas que presentaban el inserto. El producto amplificado se purificó con la enzima ExoSAPIT for PCR product cleanup (Usb Affymetrix Inc) siguiendo las instrucciones del fabricante. La preparación de las reacciones para el ciclo de secuenciación se realizó usando el buffer BigDye Terminator v3.1 y las secuencias se analizaron usando un secuenciador ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias fueron procesadas mediante el software DNA Sequencing Analysis v.5.1 (Applied Biosystems) y se realizaron ensambles mediante la aplicación BioEdit Sequence Alignment Editor. La búsqueda de secuencias similares se realizó en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Calidad del RNAt

La calidad del ARNt obtenido de las células clorofílicas de *Bouteloua gracilis* que estuvieron en estrés osmótico (14 y 21% PEG) se presenta en la Figura 1. En las muestras se observan los RNA ribosomales 28S y 18S que se encuentran en mayor proporción en las células eucariotas y se observa también un barrido en los carriles que se extiende en las regiones de bajo peso molecular, lo cual indica la presencia de RNAm. La concentración de ARNt obtenida en el biofotómetro fue de 9.2 y 2.2 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ para las células con el tratamiento de 14 y 21% PEG respectivamente.

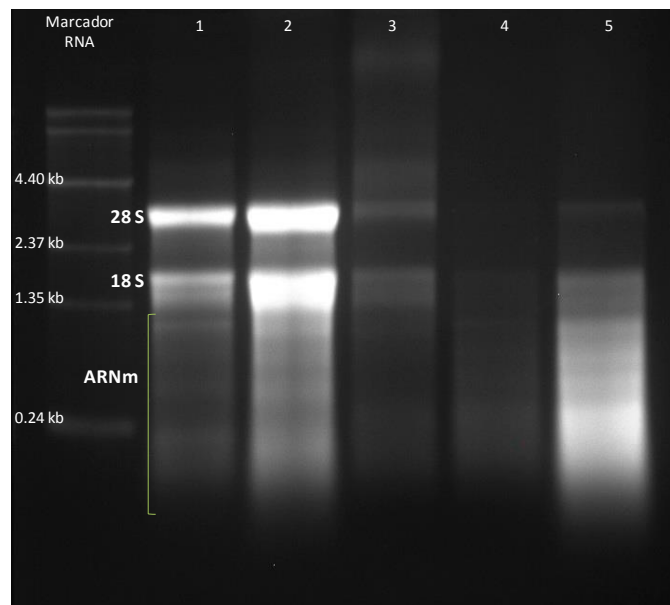


Figura 1. Extracción de RNA en plantas completas y células clorofílicas del pasto *B. gracilis* bajo tratamientos de estrés osmótico. Carril 1: Células con 21% PEG; Carril 2: Células con 14% PEG; Carril 3,4 y 5: Plantas de *B. gracilis* cultivadas bajo invernadero.

Bibliotecas de cDNA, Southern blot e hibridación de colonias en placa

Para la construcción de las bibliotecas de cDNA provenientes de células clorofílicas de *B. gracilis* en tratamientos de 14 y 21% de PEG, se utilizaron células de seis días de cultivo, debido a estudios realizados previamente por otros autores [14], que mencionan que existe una mayor cantidad de clorofila a los seis días de crecimiento de las células clorofílicas de esta gramínea y por lo tanto, en ese día podría haber una mayor concentración de osmolitos y activación de diferentes genes importantes para tolerancia a la sequía en esta especie.

En la Figura 2 se observa el crecimiento de la bacteria *Escherichia coli* transformada con el vector de clonación pDONRTM222 que contenía las secuencias de interés, esto se realizó para la verificación de las bibliotecas.

Después de realizar la hibridación de colonias en placa con las sondas, se obtuvieron 335 clonas putativas positivas. En la Figura 3 se observan los resultados del revelado de algunas hibridaciones. Las colonias que se tiñeron completamente de color negro se seleccionaron como las clonas putativas positivas. El aislamiento y subcultivo de las clonas putativas positivas se realizó en medio LB con 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de kanamicina, como se muestra en la Figura 4.

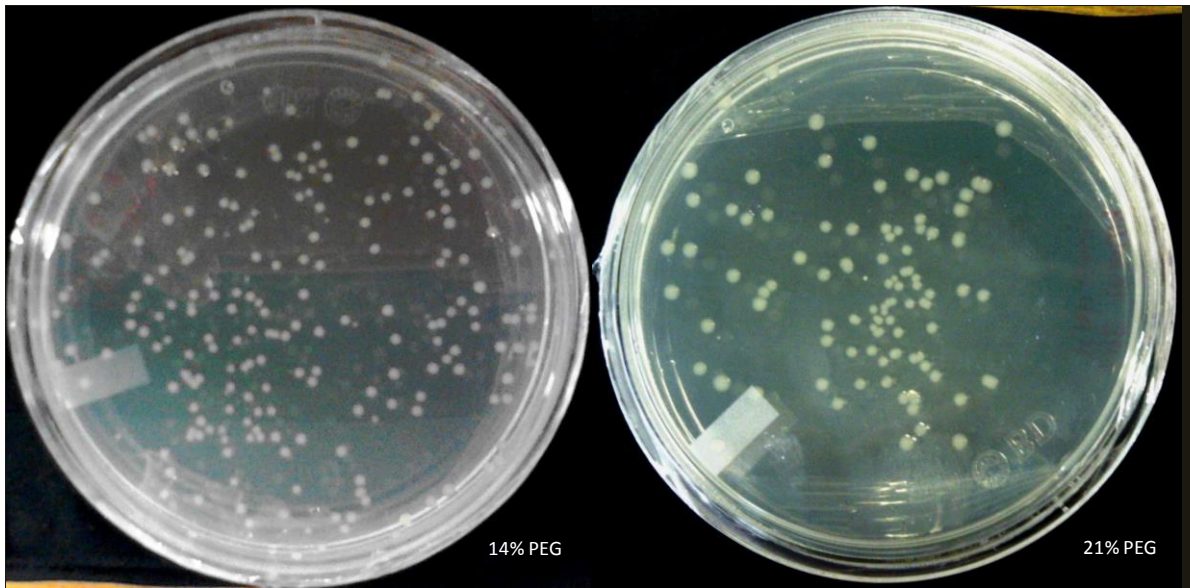


Figura 2. Colonias de *Escherichia coli* conteniendo las bibliotecas de cDNA de células clorofílicas de *B. gracilis* bajo tratamientos de estrés osmótico (14 y 21% PEG).

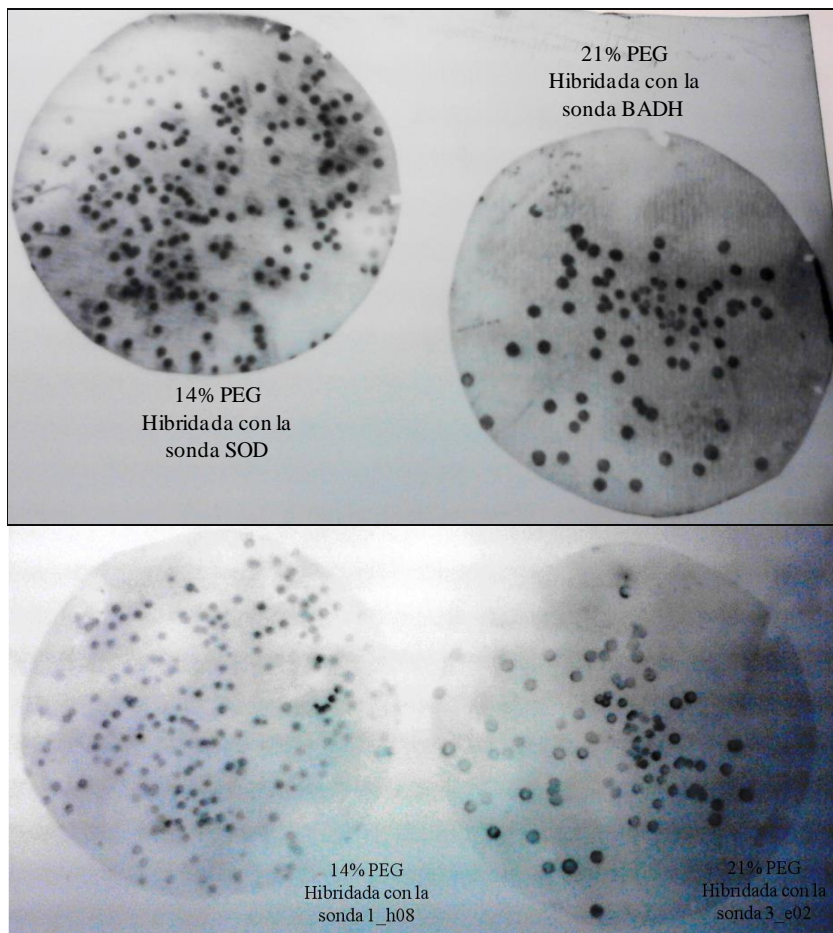


Figura 3. Hibridación de colonias en placa de las bibliotecas de cDNA de células clorofílicas de *B. gracilis* bajo tratamientos de estrés osmótico (14 y 21% PEG).

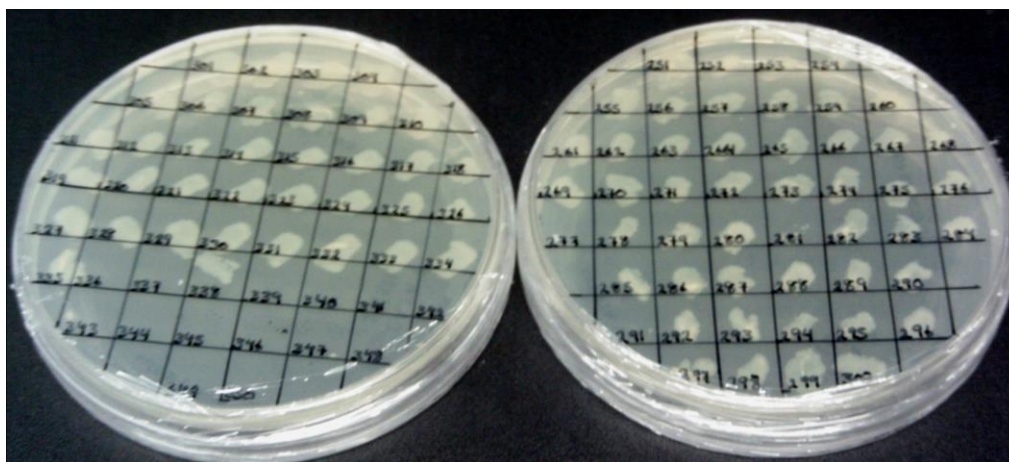


Figura 4. Clonas putativas positivas provenientes de bibliotecas de cDNA de células clorofílicas de *B. gracilis* bajo tratamientos de estrés osmótico (14 y 21% PEG).

Secuenciación

Con la finalidad de verificar las extracciones de ADN plasmídico de las clonas putativas positivas provenientes de las bibliotecas de cDNA, se realizó un gel de agarosa al 1.2%, el cual se observa en la Figura 5.

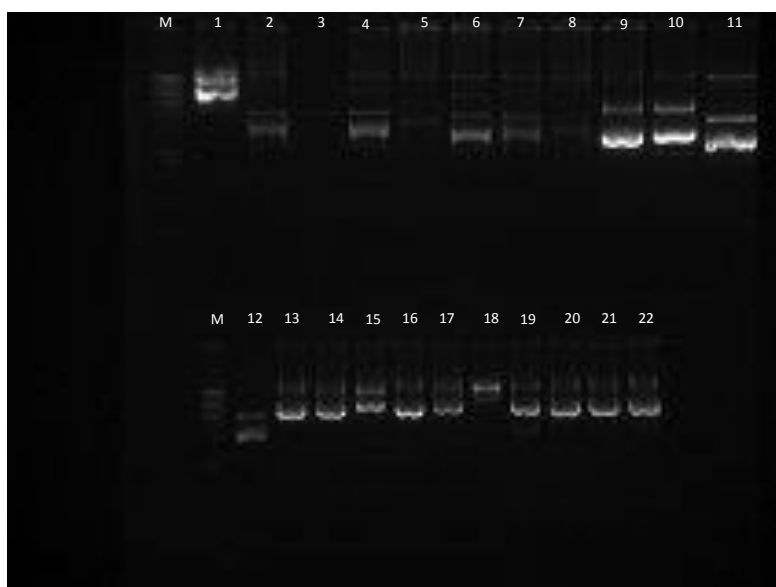


Figura 5. Extracción de ADN plasmídico de algunas clonas putativas positivas provenientes de bibliotecas de cDNA generadas a partir de células clorofílicas de *B. gracilis* bajo tratamientos de estrés osmótico. M: marcador de ADN Lambda HINDIII; carriles 1-22: clonas putativas positivas provenientes de la hibridación de la biblioteca de cDNA de células clorofílicas en tratamiento de 14% PEG con la sonda SOD.

Las amplificaciones mediante PCR, utilizando los iniciadores universales M13 permitió observar que las clonas 1, 2, 3, 5, 9, 10, 11, 13, 17, 18, 25, 35, 36, 37, 38, 39, 44, 45, 47, 48, 57, 71 y 106 mostraron insertos de interés (Figura 6), por lo que se procedió a su secuenciación.

En el Cuadro 2 se reportan los resultados de la secuenciación, los cuales se utilizaron para realizar la búsqueda de identidades en la base de datos NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), utilizando la herramienta BLASTn. Para la clona #13 hibridada con la sonda SOD, se encontró una similitud del 98% con el gen que codifica para la proteína *WOX5A* que ha sido identificada en la diferenciación celular y el metabolismo secundario de *Zea mays* [15]; 98% de similitud con proteínas PIP tipo acuaporinas HvPIP2 de *Hordeum vulgare*, que son los canales principales para la absorción de agua en células vegetales [16]) y 75% con ARNs largos no codificantes (lncRNA) de respuesta a estrés hídrico en *Zea mays*.

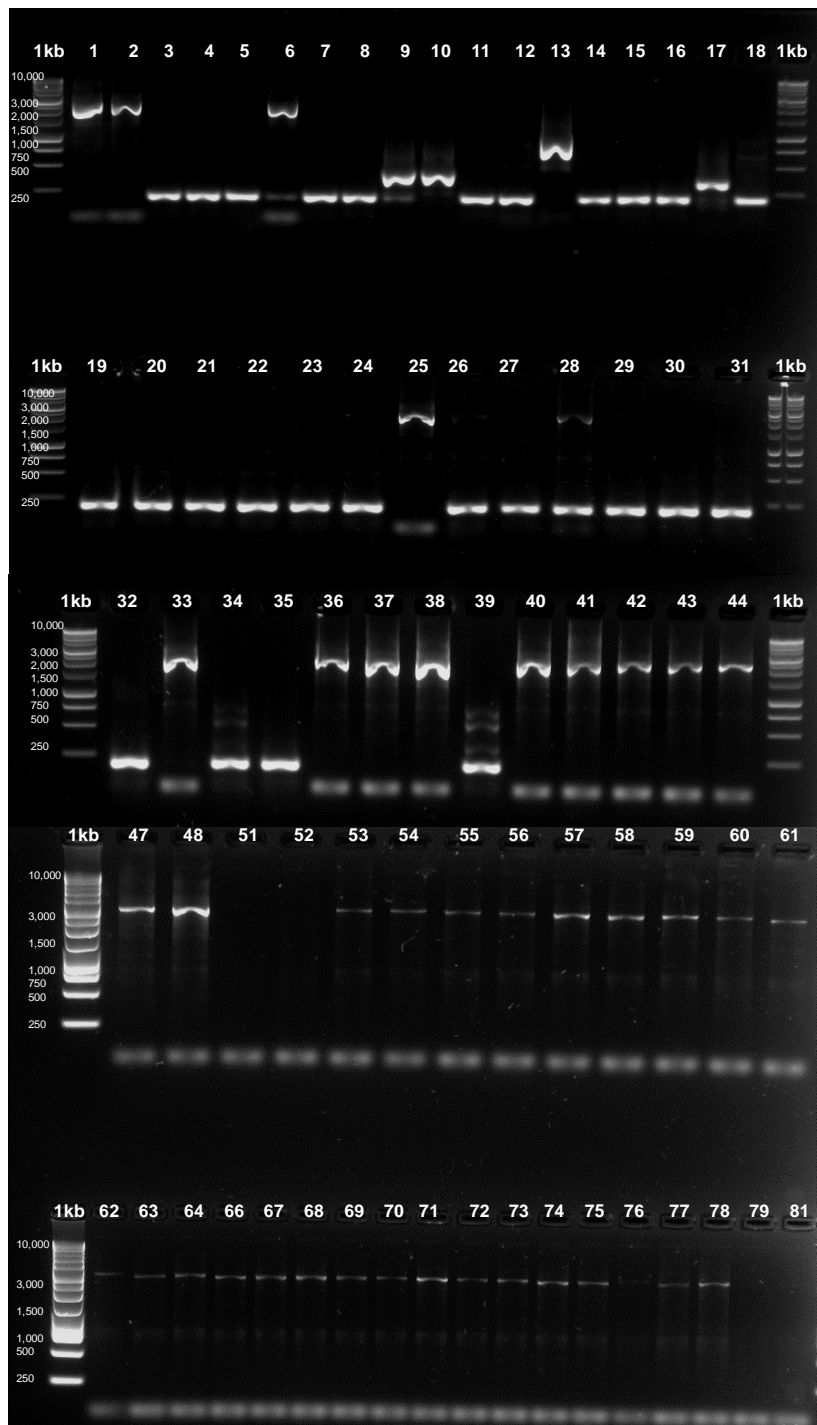

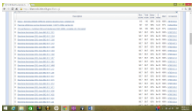






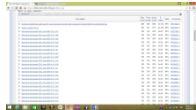
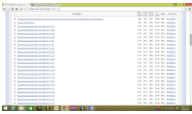


Figura 6. Amplificación de algunas de las clonas putativas positivas provenientes de bibliotecas de cDNA generadas a partir de células clorofílicas bajo tratamientos de estrés osmótico de *B. gracilis*. 1 Kb: marcador de ADN (1kb); carriles 1-35: clonas provenientes de la hibridación de la sonda SOD con la biblioteca de células clorofílicas en tratamiento de 14% PEG; carriles 37-43: hibridación de la sonda 1_h08 con células de 21% PEG; carriles 44-48: hibridación de la sonda 2_f10 con células de 21% PEG; carriles 51-52: hibridación de la sonda 3_e02 con células de 14% PEG; carriles 53-64: hibridación de la sonda 3_e02 con células de 21% PEG; carriles 66-73: hibridación de la sonda BADH con células de 14% PEG; carriles 36,74-79: hibridación de la sonda BADH con células de 21% PEG.

<p>2.- 2F</p>	<p>SOD (Superóxido Dismutasa)</p>	<p>1.- CCCGCTTCGGCGGGTTTTTTTATGG GGGGAGTTTAGGGAAAGAGCATT GTCAGAATATTAAAGGGCGCCTGTC ACTTTGCTTGATATATGAGAATTAT TTAACCTTATAAATGAGAAAAAAG CAACGCACTTTAAATAAGATACGTT GCTTTTTTCGATTGATGAACACCTAT AATTAACCTATTCATCTATTATTTA TGATTTTTTGTATATACAATATTTCT AGTTTGTAAAGAGAATTAAGAAA ATAAATCTCGAAAATAATAAAGGG AAAATCAGTTTTTTGATATCAAAT ATACATGTCAACGATAATACAAA TATAATACAACTATAAGATGTTAT CAGTATTTATTATGCATTTAGAATA AATTTTGTGTCGCCCTTA</p>	<p>1.- </p>
<p>2R</p>		<p>2.- GATATTCTTCTATACCTGGAACGCT GTTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGA GTAACCATGCATCATCAGGAGTACG GATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGT GGCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTA GTCTGACCATCTCATCTGTAACATC ATGGGCAACGCTACCTTTGCCATGT TTCAGAAACAACCTCTGGCGCATCGG GCTTCCCATACAAGCGATAGATTGT CGCACCTGATTGCCCGACATTATCG CGAGCCCATTTATACCCATATAAAT CAGCATCCATGTTGGAATTTAATCG CGGCCTCGACGTTTCCCGTTGAATA TGGCTCATATTCTTCCTTTTTCAATA TTATTGAAGCATTATCAGGGTTAT TGTCTCATGAGCGGATACATATTTG AATGTATTTAGAAAAATAAACAAA TAGGGGTCAGTGTTACAACCAATTA ACCAATTCTGAACATTATCGCGAGC CCATTTATACCTGAATATGGCTCAT AACACCCCTTGTTTGCCTGGCGGCA GTAGCGCGGTGGTCCCACCTGACCC CATGCCGAACCTCAGAAGTGAAACG CCGTAGCGCCGATGGTAGTGTGGG GGACTCCCATGCGAGAGTAGGGA ACTGCC</p>	<p>2.-  </p>

<p>3.- 3F</p> <p>3R</p>	<p>SOD (Superóxido Dismutasa)</p>	<p>1.- CTAGATGCATGCTCGAGCGGCCGCC AGTGTGATGGATATCTGCAGAATTC CAGCACACTG</p> <p>2.- AGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAAT CATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTG AAATTGTTATCCGCA</p> <p>3.- CTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTA GTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAAT TCTGCAGATATCCATCACAC</p> <p>4.- CGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCTG CAGATATCCATCACAC</p>	<p>1.- </p> <p>2.- </p> <p>3.- </p> <p>4.- </p>
<p>4.- 5R</p> <p>5F</p>	<p>SOD (Superóxido Dismutasa)</p>	<p>1.- CTTGGTACCGAGCTCGGATCCACTA GTAACGGCCGCCAGTGTGCTGGAAT TCTGCAGATATCCA</p> <p>2.- AGCTCGGTACCAAGCTTGGCGTAAT CATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTG AAATTGTTAT</p> <p>3.- GGCCCTCTAGATGCATGCTCGAGCG GCCGCCAGTGTGATGGATATCTGCA GAATTCCAGCACACTG</p>	<p>1.- </p> <p>2.- </p> <p>3.- </p>
<p>5.- 9F</p>	<p>SOD (Superóxido Dismutasa)</p>	<p>1.- GCATGCTCGAGCGGCCGCCAGTGTG ATGGATATCTGCAGAATTCGCCCTT GACTATTAGATCGGAGCGGCCGCC TTTTTTTTTTTTTTTTT</p>	<p>1.- </p>

25R		<p>AATTAAACTATTCATCTATTATTTAT GATTTTTTGTATATACAATATTTCTA GTTTGTTAAAGAGAATTAAGAAAAT AAATCTCGAAAATAATAAAGGGAA AATCAGTTTTTGTATATCAAAATTAT ACATGTCAACGATAATACAAAATAT AATACAACTATAAGATGTTATCAG TATTTATTATGCATTTAGAATAAAT TTTGTGTCGCCCTTAATTGTGAGCG GATAACAATTACGAGCTTCATGCAC AGTGAAATCATGAAAAAATTTATTT GCTTTGTGAGCGGATAACAATTATA AATATGTGGAATTGTGAGCGCTC</p> <p>2.- TGGTGAGTAACCATGCATCATCAGG AGTACGGATAAAATGCTTGATGGTC GGAAGTGGCATAAATTCCGTCAGCC AGTTTAGTCTGACCATCTCATCTGT AACATCATTGGCAACGCTACCTTTG CCATGTTTCAAAAACAACCTCTGGCG CATCGGGCTTCCCATAACAAGCGATA GATTGTCGCACCTGATTGCCCGACA TTATCGCGAGCCCATTTATACCCAT ATAAATCAGCATCCATGTTGGAATT TAATCGCGCCTCGACGTTTCCCGT TGAATATGGCTCATATTCTTCCTTTT TCAATATTATTGAAGCATTTATCAG GGTTATTGTCTCATGA</p>	<p>2.-</p> 
12.- 35F 35R	SOD (Superóxido Dismutasa)	<p>1.- AGCTCGGTACCAAGCTTGCGGTAAT CATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTG AAATTGTTATCCGCA</p> <p>2.- GGTACCGAGCTCGGATCCACTAGTA ACGGCCGCCAGTGTGCTGGAATTCT GCAGATATCCATCACAC</p>	
13.- 36F	BADH (Betaina-aldehído deshidrogenasa)	<p>1.- ATAACGTAAAAACCCCGCTTCGGCG GGTTTTTTTATGGGGGGAGTTTAGG GAAAGAGCATTGTGTCAGAATATTTA AGGGCGCCTGTCACCTTGCTTGATA</p>	

36R		<p>TATGAGAATTATTTAACCTTATAAA TGAGAAAAAAGCAACGCACTTTAA ATAAGATACGTTGCTTTTTTCGATTG ATGAACACCTATAATTAACCTATTC ATCTATTATTTATGATTTTTTGTATA TACAATATTTCTAGTTTGTTAAAGA GAATTAAGAAAATAAATCTCGAAA ATAATAAAGGGAAAATCAGTTTTTG ATATCAAATTATAACATGTCAACGA TAATACAAAATATAATACAACTAT AAGATGTTATCAGTATTTATTATGC ATTTAGAATAAATTTTGTGTGCGCC TTAATTGTGAGCGGATAACAATTAC GAGCTTCATGCACAGTGAAATCATG AAAAATTTATTTGCTTTGTGAGCG</p> <p>2.- TCTCATCTGTAACATCATTGGCAAC GCTACCTTTGCCATGTTTCAAAAAC AACTCTGGCGCATCGGGCTTCCCAT ACAAGCGATAAATTGTGCGCACCTGA TTGCCCGACATTATCGCGAGCCCAT TTATACCCATATAAATCAGCATCCA TGTTGGAATTTAATCGCGGCCTCGA CGTTTCCCGTTGAATATGGCTCATA TTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAG CATTTATCAGGGTTATTG</p>	<p>2.-</p> 
14.- 37F	(1_h08)	<p>1.- AACGTAAAAAACCCGGCTTCGGGC GGGTTTTTTTATGGGGGGAGTTTAG GGGAAAGAGCATTGTGTCAGAATATT TAAGGGCGCCTGTCACTTTGCTTGA TATATGAGAATTATTTAACCTTATA AATGAGAAAAAAGCAACGCACTTT AAATAAGATACGTTGCTTTTTTCGAT TGATGAACACCTATAATTAACCTAT TCATCTATTATTTATGATTTTTTGT TATAACAATATTTCTAGTTTGTTAAA GAGAATTAAGAAAATAAATCTCGA AAATAATAAAGGGAAAATCAGTTT TTGATATCAAATTATAACATGTCAA CGATAATACAAAATATAATACAAA CTATAAGATGTTATCAGTATTTATT ATGCATTTAGAATAAATTTTGTGTC GCCCTTAATTGTGAGCGGATAACAA</p>	

37R		<p>TTATAATATGTGGAATTGTGAGCGC</p> <p>2.- TATTCTTCTAATACCTGGAACGCTG TTTTTCCGGGGATCGCAGTGGTGAG TAACCATGCATCATCAGGAGTACGG ATAAAATGCTTGATGGTCGGAAGTG GCATAAATTCCGTCAGCCAGTTTAG TCTGACCATCTCATCTGTAACATCA TTGGCAACGCTACCTTTGCCATGTT TCAAAAACAACCTCTGGCGCATCGG GCTTCCCATAACAAGCGATAGATTGT CGCACCTGATTGCCCGACATTATCG CGAGCCCATTTATAACCATATAAAT CAGCATCCATGTTGGAATTTAATCG CGGCCTCGACGTTTCCCGTTGAATA TGGCTCATATTCTTCCTTTTTCAATA TTATTGAAGCATTATCAGGGTTAT TGTCTCATGAGCGGATACATATTTG AATGTATTTAGAAAAATAAACAAA TAGGGGTCAGTG</p> <p>3.- CCAATTAACCAATTCTGAACATTAT CGCGAGCCCATTTATACTGAATAT GGCTCATAACACCCCTTGTTTGCCT GGCGGCAGTACCGCGGTGGTCCCA CCTGACCCCATGCCGAACTCAGAAG TGAAACGCC</p>	
15.- 38F	(1_h08)	<p>1.- CGTAAAAAACCCGCTTCGGCGGGTT TTTTTATGGGGGGAGTTTAGGGAAA GAGCATTTGTCAGAATATTTAAGGG CGCCTGTCACCTTGCTTGATATATG AGAATTATTTAACCTTATAAATGAG AAAAAAGCAACGCACTTTAAATAA GATACGTTGCTTTTTTCGATTGATGA ACACCTATAATTAACTATTCATCT ATTATTTATGATTTTTTGTATATACA ATATTTCTAGTTTGTAAAGAGAAT TAAGAAAATAAATCTCGAAAATAA TAAAGGGAAAATCAGTTTTTGATAT</p>	

47R		AAGAAAATAAATCTCGAAAATAAT AAAGGGAAAATCAGTTTT 2.- ATCTGTAACATCATTGGCAACGCTA CCTTTGCC	
20.- 48F 48R	(2_f10)	1.- CCTATAATTAACTATTCATCTATT ATTTATGATTTTTTTGTATATACAATA TTTCTAGTTTGTAAAGAGAATTAA GAAAATAAATCTCGAAAATAATAA AGGGAAAATCAGTTTTTTGATATCAA AATTATACATGTCAACGATAATACA AAATATAATAAACTATAAGATGT TATCAGTATTTATTATGCATTTAGA ATAAATTTTGTGTCGCCCTTAATTG TGA 2.- CGTTGAATATGGCTCATATTCTCC	
21.- 57F	(3_e02)	1.-TTGCTTGATATATGAGAATTATTT 2.- GATTTTTTTGTATATACAATATTCTA 3.-CGATTGATGAACACCTATAA	
22.- 71F	BADH (Betaina- aldehido deshidrogenasa)	1.- GGAGTTTAGGGAAAGAGCATTGTC	
23.- 106F	(1_e05)	1.- CCGCTTTCGGCGGTTTTTTTTATGGG GGGAGTTTACGGAA	Vector de clonación

CONCLUSIONES

Se obtuvo un total de 335 clonas putativas positivas al realizar la hibridación de colonias en placa utilizando 10 sondas diferentes. Se encontró que la clona #13, hibridada con la sonda SOD obtuvo una similitud del 98% con el gen que codifica para la proteína *WOX5A* asociada con la diferenciación celular y el metabolismo secundario en *Zea mays*; 98% de similitud con acuaporinas PIP HvPIP2 de *Hordeum vulgare*; y 75% con ARNs largos no codificantes (lncRNA) de respuesta a estrés hídrico en *Zea mays*.

REFERENCIAS

- [1] C. Hayano-Kanashiro, C. Calderón-Vázquez, E. Ibarra-Laclette, L. Herrera-Estrella, J. Simpson, Analysis of gene expression and physiological responses in three Mexican maize landraces under drought stress and recovery irrigation, PLoS One 4 (2009) e7531.
- [2] M.W. Blair, A.C. Fernandez, M. Ishitani, D. Moreta, M. Seki, S. Ayling, K. Shinozaki, Construction and EST sequencing of full-length, drought stress cDNA libraries for common beans (*Phaseolus vulgaris* L.), BMC Plant Biol. 11 (2011) 171.
- [3] Q. Lin, X. Wang, J. Li, H. Zhao, M. Wang, Construction and sequence analysis of a drought-induced full-length cDNA library from *Ammopiptanthus mongolicus*, Chin. J. Biotech. 28 (2012) 86-95.
- [4] S. George, G. Venkataraman, A. Parida, Identification of stress-induced genes from the drought-tolerant plant *Prosopis juliflora* (Swartz) DC. through analysis of expressed sequence tags. Genome 50 (2007) 470-478.

- [5] J.K. Andeani, S. Mohsenzadeh, H. Mohabatkar, Isolation and characterization of partial DREB gene from four Iranian *Triticum aestivum* cultivars, *World J. Agric. Sci.* 5 (2009) 561-566.
- [6] R. García-Sánchez, A. Monroy-Ata, Micrositios del pasto navajita (*Bouteloua gracilis*) en comunidades de pastizal y de matorral del Altiplano Mexicano. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 8 (2005) 61-70.
- [7] P. Ordóñez, Análisis de expresión y clonación de genes involucrados en la respuesta al estrés hídrico de *Bouteloua gracilis*. Tesis de Maestría en Ciencias, FCQ UACH Chihuahua, Chihuahua, Chih., 2007.
- [8] D. Betancourt, Mapa físico del genoma de cloroplasto de *Bouteloua gracilis* como herramienta molecular de análisis, Tesis de Maestría en Ciencias, FCQ UACH Chihuahua, Chihuahua, Chih., 2007.
- [9] G.A. Aguado-Santacruz, J.L. Cabrera-Ponce, E. Ramírez-Chávez, C.G. León Ramírez, Q. Rascón-Cruz, L. Herrera-Estrella, V. Olalde-Portugal, Establishment, characterization and plant regeneration from highly chlorophyllous embryogenic cell cultures of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.). *Lag. ex. Steud, Plant Cell Rep.* 20 (2001) 131-136.
- [10] T. Murashige, F. Skoog, A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures, *Physiol. Plantarum* 15 (1962) 473-497.
- [11] Boehringer Mannheim GmbH, The DIG System User's Guide for Filter Hybridization, Boehringer Mannheim Biochemica, Mannheim, Germany, 1995.
- [12] CIMMYT, Laboratory Protocols. Third ed., CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory, CIMMYT, Mexico, D.F., 2005.

- [13] H.C. Birnboim, J. Doly, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* 7 (1979) 1513-1523.
- [14] X. García-Valenzuela, E. García-Moya, Q. Rascón-Cruz, L. Herrera-Estrella, G.A. Aguado-Santacruz, Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyll cells, *J. Plant Physiol.* 162 (2005) 650-661.
- [15] J.A. Huerta-Ocampo, M.F. León-Galván, L.B. Ortega-Cruz, A. Barrera-Pacheco, A. De León-Rodríguez, G. Mendoza-Hernández, A.P. Barba de la Rosa, Water stress induces up-regulation of DOF1 and MIF1 transcription factors and down-regulation of proteins involved in secondary metabolism in amaranth roots (*Amaranthus hypochondriacus* L.), *Plant Biol.* 13 (2011) 472-482.
- [16] T. Horie, T. Kaneko, G. Sugimoto, S. Sasano, S.K. Panda, M. Shibasaka, M. Katsuhara, Mechanisms of water transport mediated by PIP aquaporins and their regulation via phosphorylation events under salinity stress in barley roots. *Plant Cell Physiol* 52 (2011) 663-675.