



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN QUE
CODIFICA PARA UNA PROTEÍNA
TRANSPORTADORA DE LÍPIDOS DE *Opuntia*
streptacantha BAJO ESTRÉS ABIÓTICO

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Agricultura Sustentable)

P r e s e n t a

Mario Rojas Arzaluz

La Paz, Baja California Sur, febrero de 2012

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las ___ horas del día ___ del Mes de Febrero del 2012, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN QUE CODIFICA PARA UNA PROTEÍNA TRANSPORTADORA DE LÍPIDOS DE *Opuntia streptacantha* BAJO ESTRÉS ABIÓTICO”

Presentada por el alumno:

Mario Rojas Arzaluz

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Agricultura Sustentable**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISION REVISORA



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
CO-TUTOR



Dr. Carlos Eliud Angulo Veladez
CO-TUTOR



DRA. ELISA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Comité Tutorial

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste S.C.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont Instituto Potosino de Investigación
Científica y Tecnológica A.C.

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste S.C.

Jurado de Examen

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste S.C.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont Instituto Potosino de Investigación
Científica y Tecnológica A.C.

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste S.C.

Suplente

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle Centro de Investigaciones Biológicas del
Noroeste S.C.

RESUMEN

El nopal crece en condiciones extremas de temperatura y disponibilidad de agua, por lo que posee mecanismos específicos para contrarrestar el estrés, entre ellos mecanismos moleculares que involucran la expresión de genes. Mediante un análisis de expresión de genes se encontró una proteína transportadora de lípidos que se induce por estrés abiótico. Las proteínas transportadoras de lípidos (LTPs) poseen la propiedad (*in vitro*) de transferir lípidos entre membranas, a pesar de muchos estudios no existen evidencias claras de una función biológica específica. Por lo que el objetivo del presente trabajo fue caracterizar funcionalmente en *Arabidopsis thaliana* el gen de una LTP de nopal en la respuesta a estrés abiótico. Para ello se transformaron levaduras con la construcción PYES 2.1::*OpsLTP1* y se evaluó su respuesta al estrés salino (NaCl, 1.5 M), alcalino (Na₂CO₃, 37 mM) y estrés por congelamiento (-20°C, 48h). Igualmente se evaluó la función de *AtLTP3* en plantas de *A. thaliana*, mediante el uso de una mutante insercional con pérdida de función (SALK_095248) y plantas sobre-expresantes con la construcción 35S 2X::*OpsLTP1* (Over-*OpsLTP1*). Se evaluó la germinación, talla de la raíz, número de cotiledones verdes y recuperación en plántulas bajo estrés salino (NaCl) y osmótico (PEG-8000); para el caso de congelamiento (-20°C, 2h), se evaluó la recuperación en plántulas. Los resultados en levaduras mostraron diferencias significativas entre las levaduras control y las que tenían el gen de LTP en respuesta a NaCl (16 h) y Na₂CO₃ (8 y 16 h), sin embargo no se consideraron cambios biológicamente significativos debido a que la diferencia en las curvas de crecimiento fue pequeña. Las transformaciones genéticas de *A. thaliana* mostraron que la LTP está involucrada en los procesos de germinación, dado que se observó un aumento de 24.3% en la germinación de plantas Over-*Ops-LTP1*. Además la LTP está involucrada en la respuesta al estrés salino (NaCl) y osmótico (PEG), lo que se observó en plantas SALK que presentaron un retraso en germinación en presencia de NaCl (100 mM) a los días 5, 6, 7 y 9, así como por PEG (-0.57MPa) a los días 6, 8, 9, 10 y 11; A diferencia de ello, las Over-*OpsLTP1* presentaron un incremento en la germinación en presencia de NaCl (100 mM) a los días 8, 9, 10 y

11, así como por PEG (-0.41MPa) a los días 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 comparado con col-0. Se observaron también diferencias significativas en la talla de la raíz y el número de cotiledones verdes de plantas SALK en respuesta a NaCl 75 y 100 mM. En conclusión, nuestros resultados muestran que *OpsLTP1* es un gen inducible y altamente regulado, involucrado en los procesos de germinación y elongación de la raíz así como en mecanismos de respuesta al estrés hídrico y salino.

Palabras clave: Proteína transportadora de lípidos (LTP), expresión de genes, Transformación de *Arabidopsis*.

ABSTRACT

Cactus pear grows in extreme temperature and water availability conditions so it has specific mechanisms to counteract stress, including molecular mechanisms involving gene expression. By analyzing gene expression we found a lipid transfer protein induced by abiotic stress. Lipid transfer proteins (LTPs) have the property (*in vitro*) of transporting lipids between membranes. Despite many studies, there is no clear evidence of a specific biological function yet. So the aim of this study was to characterize an LTP gene of cactus pear functionally in *A. thaliana* in response to abiotic stress. To accomplish this, we transformed yeasts with construction pYES2.1::*OpsLTP1* and evaluated their response to salt (NaCl, 1.5 M), alkali (Na₂CO₃, 37 mM), and freezing stress (-20 °C, 48h). Also, we evaluated the role of *AtLTP3* in *A. thaliana* plants by using insertional mutant plants lacking the function (SALK_095248) and in overexpression plants with the construction 2X 35S::*OpsLTP1* (Over-*OpsLTP1*). We evaluated germination, root length, number of green cotyledons, and recovery in seedlings under salt (NaCl) and osmotic (PEG-8000) stress; in the case of freezing (-20 °C, 2h) stress, we assessed the recovery of seedlings. The results in yeast showed significant differences between control yeast and that with the LTP gene in response to NaCl (16 h) and Na₂CO₃ (8 and 16 h). However, we could not consider significant biological changes because the difference in growth curves was small. Genetic transformation of *A. thaliana* showed that LTP is involved in germination processes since there was an increase of 24.3% in plant germination Over-*Ops-LTP1*. Furthermore, the LTPs involved in salt (NaCl) and osmotic (PEG) stress responses, which were observed in SALK plants showing a germination delay in the NaCl (100 mM) at days 5, 6, 7, and 9, as well as by PEG (-0.57 MPa) at days 6, 8, 9, 10, and 11; in contrast, the Over *OpsLTP1* showed an increase in germination in the presence of NaCl (100 mM) at days 8, 9, 10, and 11, as well as by PEG (-0.41 MPa) at days 5, 6, 7, 8, 9, 10, and 11 compared with Col-0. We also observed significant differences in the root size and number of green cotyledon

SALK plants in response to 75 and 100 mM NaCl. In conclusion, our results show that *OpsLTP1* is an inducible gene and that highly regulated processes are involved in germination and root elongation as well as stress response mechanisms of water and salt.

Keywords: Lipid Transfer Protein (LTP), gene expression and *Arabidopsis* transformation

La presente tesis la dedico a mis padres y hermanos por su apoyo y confianza. Gracias por ayudarme a cumplir mis objetivos como persona y como estudiante.

AGRADECIMIENTOS

Quiero extender mis sinceros agradecimientos con todas las personas que de alguna manera contribuyeron para la realización de esta tesis.

Al **Centro Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por la beca Otorgada de Nivel Maestría.

A el **Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR)** por las facilidades prestadas, para la realización de este trabajo.

Al **Laboratorio de Biología Molecular de Plantas (CIBNOR)**. Por ser el lugar donde se desarrollo la mayor parte de este trabajo, que es Dirigido por la **Dra. Gracia A. Gómez Anduro**, así como a **M.C. Julio A. Hernández González**, por las facilidades prestadas.

Al **Laboratorio de Biología Molecular de Hongos y Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT)**. Dirigido por el **Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**. Así como al personal que labora en el, por las facilidades prestadas para realizar gran parte de la fase experimental de este trabajo.

Al proyecto: Análisis molecular de los genes de nopal implicados en estrés y su caracterización funcional en *Arabidopsis* (**CONACYT 103 106**)

Al **Laboratorio de Patogénesis Microbiana (CIBNOR)**, por los servicios prestados. A el **Dr. Felipe Ascencio Valle**, que dignamente dirige este laboratorio, así como a al personal que en el labora.

Al **Laboratorio de Biotecnología Vegetal (M.C. Mario Arce Montoya, M.C. Margarito Rodríguez Álvarez, Sergio Manuel Real Cosío)**, **Laboratorio de Fisiotecnia Vegetal (María del Carmen Mercado Guido)**, **Laboratorio de Histología e Histoquímica (M.C. María del Carmen Rodríguez Jaramillo)**, **Laboratorio de Microscopia Electrónica (Ariel Arturo Cruz Villacorta)**,

Laboratorio de Microbiología Ambiental, Laboratorio de Genética Molecular, Laboratorio de Biotecnología de Organismos Marinos (CIBNOR), así como a su equipo de trabajo que en cada uno de ellos labora por las facilidades prestadas.

A la **M.C. Diana Dorantes**, por su apoyo para la edición de este documento.

A mi asesor **Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez**, por sus consejos como amigo y sus aportes para elaboración de esta tesis.

Un agradecimiento especial para La **Dra. Gracia Gómez Anduro**, a quien admiro mucho y la considero como una persona de mi familia, que en todo momento me ayudo para terminar este trabajo. Le agradezco la paciencia que mantuvo durante todo este tiempo para trasmitirme su conocimiento y todos sus consejos personales.

A todos mis compañeros y amigos del grupo de **Patogénesis-Plantas**, quienes de alguna manera me ayudaron en lo personal y/o en lo académico, Martita, Norma, Estercita, Carolina, Oney, Paty, Eka, Julio, Norberto, Carlos, Sergito y Rockdrigo.

A todos mis **compañeros de generación**, que de alguna manera hicieron que mi estancia en La Paz, fuera divertida. Alejandra, Paola, Sara, Ivonne, Claudia, Cristal, Carol, Mabilia, Alex (Aldo), Saúl (seño), Juan Carlos (Jota C), Eduardo (lalo), Daniel (Gaylord) y todos los que se olvidaron.

y... Por su puesto. A toda la palomilla paceña y buenos amigos que conocí por estos rumbos.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	I
LISTA DE TABLAS	IV
1. INTRODUCCIÓN	1
2 ANTECEDENTES	3
2.1 Estrés abiótico en plantas	3
2.2 Estrés salino	4
2.3 Estrés osmótico	4
2.4 Estrés por bajas temperaturas	5
2.5 Respuesta cruzada ante el estrés salino, osmótico y bajas temperaturas en plantas	6
2.6 Modelos biológicos para estudios de evaluación de genes involucrados en estrés	8
2.7 Características de <i>Opuntia streptacantha</i> ante el estrés abiótico	9
2.8 Proteínas Transportadoras de Lípidos	11
2.9 Expresión de LTP's	12
2.10 Posibles funciones de las proteínas transportadoras de lípidos en plantas	14
2.11 LTP's en respuesta a estrés abiótico	15
3. JUSTIFICACIÓN	17
4. HIPÓTESIS	18
5. OBJETIVOS	18
5.1 Objetivo general	18
5.2 Objetivos particulares	18

6. MATERIALES Y MÉTODOS	19
6.1 Materiales Biológicos	19
6.2 Plásmidos	19
6.3 Métodos	21
6.3.1 Métodos bioinformáticos	21
6.3.2 Cultivo de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	22
6.3.3 Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	22
6.3.4 Cultivo de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV2260	22
6.3.5 Cultivo <i>in vitro</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
6.3.6 Cultivo de <i>A. thaliana</i> en sustrato sólido.....	23
6.3.7 Clonación en el vector pYES2.1	24
6.3.8 Clonación en el Vector pCR8GW TOPO TA Cloning.....	24
6.3.9 Recombinación	24
6.3.11 Tamizaje de semillas transformadas	29
6.3.12 Extracción de ADN plasmídico por el Método de Lisis Alcalina (Modificado de Sambrook y Russell, 2001)	31
6.3.13 Aislamiento de ADN genómico	32
6.3.14 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	33
6.3.15 Electroforesis	35
6.3.16 Estrés salino en levaduras.....	35
6.3.17 Estrés térmico a -20°C en levaduras	36
6.3.18 Estrés alcalino en levaduras	36
6.3.19 Estrés salino y Osmótico en germinación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	37
6.3.20 Estrés salino y osmótico en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	38

6.3.21 Estrés térmico a -20°C en plántulas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	38
6.3.22 Aplicación de Procesamiento de Imágenes para la medición de raíces de <i>Arabidopsis thaliana</i>	39
6.3.22.1 Adquisición de la Imagen.....	39
6.3.23 Análisis estadístico	41
7. RESULTADOS.....	42
7.1 Caracterización bioinformática de LTP	42
7.2 Evaluación de levaduras W303-1A transformadas con la construcción pYES2.1::OsLtpne en estrés salino y estrés alcalino.....	49
7.3 Selección y evaluación de mutantes homocigotas con pérdida de función para el gen AtLTP3 de <i>A. thaliana</i> bajo estrés salino y osmótico	54
7.4 Obtención y evaluación de plantas <i>A. thaliana</i> que sobre-expresen el gen OpsLTP bajo estrés salino y osmótico.....	64
7.4.1 Comprobación de los niveles de expresión del transgén por qPCR.....	66
7.4.2 Evaluación de plantas <i>A. thaliana</i> que sobre-expresen el gen <i>OpsLTP</i> bajo estrés salino y osmótico.....	67
7.5 Estrés térmico (-20 °C)	75
7.6 Talla de la semilla	77
8 DISCUSIÓN	78
8.1 Evaluación funcional del gen OpsLTP en <i>S. cerevisiae</i> W303-1A bajo estrés abiótico.	78
8.2 Evaluación funcional del gen OpsLTP en <i>A. thaliana</i> bajo estrés abiótico..	80
9. CONCLUSIÓN	84
10 ANEXOS	99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ruta general de respuesta a el estrés salino, osmótico y bajas temperaturas	7
Figura 2. Orientación de la cadena de la LTP ₁ y LTP ₂	12
Figura 3. Mapa físico del vector pYES2.1/V5-His-TOPO®.....	19
Figura 4. Mapa físico del vector pCR/8/GW/TOPO®	20
Figura 5. Mapa físico del vector pMDC32.	20
Figura 6. Imágen de raíces obtenida mediante un escaner de hoja completa.. ...	40
Figura 7. Interface gráfica de usuario para medir la longitud de la raíz.....	41
Figura 8. Alineamiento múltiple de secuencias de LTP's reportadas en Carvalho y Gómez (2007)	43
Figura 9. Características generales del gen de <i>OpsLTP</i>	44
Figura 10. Filograma realizado con secuencias de LTP de plantas.	44
Figura 11. Alineamiento múltiple de 5 de LTPs de <i>A. thaliana</i> y <i>Opuntia streptachanta</i>	46
Figura 12. Diagrama donde se representa los niveles de expresión del gen AtLTP3 bajo cuatro diferentes tratamientos: 4°C, 300 mM Manitol, 150 mM NaCl y Aire seco.....	46
Figura 13. Expresión de LTP3 por tejido	47
Figura 14. Identificación de levaduras con la construcción pYES2.1:: <i>Opsltpne</i> ..	49
Figura 15. Curva de crecimiento de levaduras bajo estrés salino (1.5 M NaCl)...	51
Figura 16. Curva de crecimiento de levaduras bajo estrés alcalino (Na ₂ CO ₃ 37 mM).....	52
Figura 17. Curva de crecimiento de levaduras bajo estrés por congelamiento (-20°C, 48 h).....	53
Figura 18. Selección de mutantes homocigotas de <i>A. thaliana</i>	54
Figura 19. Porcentaje de germinación de <i>A. thaliana</i> , Col-0 y SALK durante 11 días de muestreo	56

Figura 20. Plántulas de <i>A. thaliana</i> después de 15 días de germinadas en estrés salino.....	57
Figura 21. Efecto de la Salinidad por NaCl en plantas SALK y Col 0 de <i>A. thaliana</i>	58
Figura 22. Plantas de <i>A. thaliana</i> recuperadas después de 10 días de exposición en diferentes concentraciones de NaCl.	59
Figura 23. Porcentaje de germinación de <i>A. thaliana</i> Col-0 y SALK monitoreado durante 11 días.	61
Figura 24. Plántulas de <i>A. thaliana</i> después de 15 días de germinadas en estrés osmótico.....	62
Figura 25. Efecto del estrés osmótico (PEG-8000) en plantas de <i>A. thaliana</i>	63
Figura 26. Plantas de <i>A. thaliana</i> recuperadas después de 8 días de exposición en diferentes concentraciones de PEG.....	64
Figura 27. Geles de agarosa al 1%.....	65
Figura 28. Plantas de <i>A. thaliana</i> a las que se les transformaron con la construcción 35S 2X:: <i>OpsLTP</i> mediante la técnica de inmersión floral	65
Figura 29. Cuantificación relativa de mRNA de PTL con respecto a EF1 de <i>A. thaliana</i> por PCRq.....	66
Figura 30. Porcentaje de germinación de <i>A. thaliana</i> Col-0 y Over- <i>OpsLTP</i> durante 11 días de muestreo	68
Figura 31. Plántulas de <i>A. thaliana</i> después de 15 días de germinadas en estrés salino NaCl.....	69
Figura 32. Efecto de la Salinidad por NaCl en plantas Over- <i>OpsLTP</i> y Col 0 de <i>A. thaliana</i>	70
Figura 33. Plantas de <i>A. thaliana</i> recuperadas después de 10 días de exposición en diferentes concentraciones de NaCl.	70
Figura 34. Porcentaje de germinación de <i>A. thaliana</i> , Col-0 y Over- <i>OpsLTP</i>	72
Figura 35. Plántulas de <i>A. thaliana</i> después de 15 días de germinadas en estrés osmótico a diferentes concentraciones de PEG-8000	73

Figura 36. Efecto del estrés osmótico en plantas <i>Over-OpsLTP</i> y Col-0 de <i>A. thaliana</i>	74
Figura 37. Plantas de <i>A. thaliana</i> recuperadas después de 10 días de exposición en diferentes concentraciones de PEG-8000.....	74
Figura 38. Porcentajes de germinación de SALK, <i>Over-OpsLTP</i> y Col-0 en respuesta a estrés por congelamiento.	75
Figura 39. Plantas de de <i>A. thaliana</i> después de 15 días de recuperación del estrés a -20 °C	76
Figura 40. Tamaño de las semillas.....	77

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Expresión tejido específico de 7 LTPs de <i>A. thaliana</i> (Modificado de Chae <i>et al.</i> , 2010).	13
Tabla II. Ubicación cromosómica, coordenadas, y nombre de los genes de <i>A. thaliana</i> con mayor identidad a la secuencia de <i>OpsLTP</i>	45
Tabla III. Elementos de respuesta dentro de 2000 pares de bases río arriba del gen <i>AtLTP3</i>	48

1. INTRODUCCIÓN

Los tipos de estrés abiótico tales como la sequía, salinidad, las temperaturas extremas, la toxicidad química y el estrés oxidativo son amenazas serias para la agricultura y el medio ambiente en general (Wang *et al.*, 2003). La sequía, la salinidad y las temperaturas extremas a menudo pueden causar daños celulares similares (Zhu, 2001). Por ejemplo, cualquiera de esos tipos de estrés inicialmente genera un estrés osmótico, disrupción en la homeostasis y distribución de iones en las células, y con ello la desnaturalización y pérdida de función de proteínas estructurales (Zhu, 2001).

Las plantas adquieren resistencia al medio ambiente mediante la reprogramación del metabolismo y la expresión génica, lo que conlleva a un equilibrio entre el crecimiento, desarrollo y supervivencia, por lo que la resistencia al estrés es un proceso complejo, ya que se encuentran involucrados una gran cantidad de procesos (Mazzucotelli *et al.*, 2008). Como resultado del estrés, las plantas pueden responder con un amplio rango de respuestas fisiológicas, a nivel molecular y celular (Hasegawa *et al.*, 2000). Estas incluyen cambios en el crecimiento, el desarrollo y la morfología de las plantas (inhibición del crecimiento apical, incremento en el crecimiento de raíces y cambios en el ciclo de vida), ajuste en el transporte iónico (concentración expulsión y secuestro de iones), cambios metabólicos (metabolismo del carbono y la síntesis de solutos compatibles) y con ello cambios en la expresión de genes de respuesta a dicho estímulo (Yancey *et al.*, 1982). Numerosos trabajos en biología molecular ponen en evidencia la expresión diferencial de genes que se ven inducidos por efecto del estrés salino, aunque en algunos de éstos no se ha comprobado su participación directa en los mecanismos de tolerancia a dicho estrés. Como ejemplos, se encuentran los trabajos de Zhang *et al.* (2001), donde obtuvieron genes expresados diferencialmente por estrés salino en plantas de *Sauceda salsa*; del grupo del Dr. Cushman que han reportado la relación de transcritos en respuesta a estrés salino en plantas de *Mesembryanthemum crystallinum* (Kore-

eda *et al.*, 2004); de Torres *et al.* (1992), quienes reportaron la inducción de genes que codifican para una proteína transportadora de lípidos mediante estímulos salinos en plantas de tomate; y finalmente el trabajo de Ochoa-Alfaro *et al.* (2011) que reportan la inducción de diversos genes involucrados en la tolerancia al estrés abiótico en *Opuntia streptacantha*, dentro de ellos una proteína transportadora de lípidos (*OpsLTP1*).

Las proteínas transportadoras de lípidos llevan este nombre debido a que se les ha demostrado su funcionalidad *in vitro* como facilitadoras del transporte de varios lípidos (Kader, 1996), pero aún se desconoce con precisión cuál es su papel durante el estrés salino (Wang *et al.*, 2008). Se ha sugerido algunas de sus funciones basadas en su expresión en tejidos específicos y en la inducción de la expresión en respuesta a algunos estímulos como el ácido abscísico (Arondel *et al.*, 2000; Yubero-Serrano *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2009), estrés osmótico (Kader, 1996), bajas temperaturas (Molina *et al.*, 1996; Hinchá *et al.*, 2001), sequía (Treviño y O'Connell, 1998; Cameron *et al.*, 2006) y salinidad (Dani *et al.*, 2005; Ailli *et al.*, 2006; Kader, 1996). Algunos autores sugieren que las LTPs podrían estar implicadas en el transporte y el depósito de cutina. Las observaciones de los aumentos en los niveles de ARNm de algunas LTPs se encuentran relacionadas con la acumulación de la capa de cera cuticular. Se ha propuesto que durante el estrés salino la LTP-7a2b de *Hordeum vulgare* puede ser inducida por las condiciones hídricas desfavorables para promover el aumento en el depósito de material cuticular, disminuyendo la transpiración foliar (Hollenbach *et al.*, 1997). La comprensión de los mecanismos por los cuales las plantas perciben y transducen las señales del estrés para iniciar la respuesta de adaptación, aclimatación, evasión o en su defecto la muerte, resulta ser esencial para el entendimiento de la respuesta global (Gaspar *et al.*, 2002). El presente trabajo, presenta un acercamiento a la funcionalidad que tiene una LTP del nopal (*Opuntia streptacantha*) (*OpsLTP1*) así como los cambios fenotípicos observables en

plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con el gen de *OpsLTP1* en respuesta al estrés abiótico.

2 ANTECEDENTES

2.1 Estrés abiótico en plantas

El estrés es la pérdida de la homeostasis debido a “respuestas específicas” a determinado factor de estrés o “respuestas generalizadas” y no específicas (Chrousos *et al.*, 1992). Puede dividirse en “*eustrés*” que es una tensión la cual puede mejorar funciones, y “*diestrés*” que puede tener efectos perjudiciales con respecto al ciclo de vida (Kraner *et al.*, 2010). Las plantas son organismos sésiles y se encuentran en medio ambiente cambiante, sometidas a estrés biótico y abiótico que causan considerables pérdidas en el rendimiento de las plantas en todo el mundo (Walley *et al.*, 2007). Este trabajo se enfoca al estrés abiótico, los cuales afectan a las plantas durante todo su desarrollo; éstos pueden ser: altas o bajas temperaturas, déficit de agua, anegamiento, factores ligados al suelo (salinidad, alcalinidad, metales pesados, déficit de nutrientes, etc.), y otros generados por residuos tóxicos (Nagarajan y Nagarajan, 2010). La sequía, la salinidad y las bajas temperaturas representan los principales problemas para la agricultura (Zhu, 2002).

Las plantas han desarrollado mecanismos de defensa, reparación y adaptación al estrés, estos mecanismos le permiten sentir el estrés (percepción del estrés) y reconocer esas señales. Lo anterior provoca que haya cambios específicos en diferentes niveles estructurales que pueden ser: cambios en el comportamiento fisiológico, bioquímico, así como cambios en la expresión de genes específicos de respuesta al estrés (Biswal *et al.*, 2011). De acuerdo con Zhu (2002), las respuestas de las plantas se pueden organizar en cuatro aspectos de manera general: 1.- Homeostasis de iones, 2.- ajuste metabólico, 3.- detoxificación celular 4.- control en el crecimiento (regulación de fitohormonas).

2.2 Estrés salino

De acuerdo con la FAO (<http://www.fao.org/docrep/004/y3557e/y3557e08.htm#m>, World Agriculture towards 2015-2030): la salinización se produce en las zonas de regadío, cuando un drenaje inadecuado hace que las sales se concentran en las capas superiores del suelo donde se arraigan las plantas. Se trata de un problema principalmente en las zonas áridas y semiáridas, donde puede ser de 10 a 50 por ciento de la superficie de regadío afectadas. La salinización puede provocar disminuciones de rendimiento de 10 a 25 por ciento para muchos cultivos y puede impedir todo cultivo cuando es severa. Se estima que un 3% de las tierras agrícolas del mundo se ven afectadas, y por ejemplo en Asia oriental la proporción es de 6% y en el sur de Asia del 8%, mientras que para zonas tropicales áridas y semiáridas (en su conjunto) es del 12%.

El estrés salino altera la homeostasis del potencial del agua y de la distribución de iones, y se produce tanto a nivel celular como en toda la planta. Para lograr la tolerancia en las plantas se deben dar tres procesos importantes: 1) prevenir el daño; 2) las condiciones de homeostasis deben ser restablecidas en el entorno estresante; 3) el crecimiento de la planta debe de continuar aunque a un ritmo reducido (Zhu, 2001).

2.3 Estrés osmótico

El crecimiento vegetativo de las plantas requiere de la disponibilidad de agua, que puede ser medida por la energía potencial de una determinada masa de agua (potencial hídrico ψ) (Azcón-Bieto y Talon, 2000). El estrés hídrico se produce por un aumento en el potencial osmótico del suelo que disminuye la disponibilidad de agua para la planta, rompiendo la homeostasis celular (Azcón-Bieto y Talon, 2000). Bajo condiciones naturales los principales causantes de estrés osmótico son la alta salinidad, el frío y la sequía (Xiong y Zhu, 2002). En respuesta al estrés, la primera respuesta de las plantas es mediante cambios morfológicos y de

desarrollo, ajuste del transporte de iones, cambios metabólicos para la biosíntesis de solutos compatibles y del metabolismo del carbono (Munns, 2002). La segunda respuesta al estrés osmótico está dada por fitohormonas como el ácido abscísico (ABA) y el etileno, así como también por la producción de especies reactivas de oxígeno (Rodríguez *et al.*, 2005).

2.4 Estrés por bajas temperaturas

Cuando la temperatura ambiental se desvía de lo óptimo, se producen cambios fisiológicos, bioquímicos, metabólicos y moleculares. Donde dependiendo el grado de disfunción esto puede conllevar a la muerte (Yadav, 2010). Dentro del estrés por bajas temperaturas, se consideran: el estrés por frío que incluye temperaturas menores a 20 °C y el estrés por congelamiento que son temperaturas por debajo de 0 °C. De manera indirecta a través del frío se induce un estrés osmótico, ya que el frío inhibe la absorción de agua y en el punto de congelación implica una deshidratación celular, así como una oxidación, entre otros factores de estrés (Chinnusamy *et al.*, 2007). En este sentido las plantas primero tratan de ajustar su metabolismo celular que fue alterado ya que la temperatura puede cambiar la estructura y propiedades de las enzimas; en segundo lugar en la planta debe de haber una regulación de las relaciones del agua celular, en este caso se debe de evitar la deshidratación celular, donde actúan solutos compatibles, estabilización de enzimas y membranas (Kubien *et al.*, 2003). La restructuración de membranas lipídicas, la estructura física, así como la composición de las mismas permite obtener un adecuado funcionamiento de la célula (Farooq *et al.*, 2009).

2.5 Respuesta cruzada ante el estrés salino, osmótico y las bajas temperaturas en plantas

El estrés salino, osmótico y las bajas temperaturas se encuentran entre los principales tipos de estrés que limitan el crecimiento de las plantas y su productividad (Xiong *et al.*, 2002; Mahanjan y Tuteja, 2005). En general las bajas temperaturas originan principalmente una restricción mecánica para la disposición del agua, mientras que el estrés salino y osmótico rompen el equilibrio iónico y osmótico (Mahanjan y Tuteja, 2005). Como respuesta a estos factores de estrés una gran cantidad de genes son regulados, los cuales ayudan a mitigar el efecto del estrés, y de esta manera las plantas toleran el estresor (Xiong *et al.*, 2002). En la naturaleza un estrés generalmente no se presenta solo, regularmente vienen de la mano con otro u otros tipos de estrés. Es por ello que se ha propuesto que las respuestas a estos son cruzadas donde en ocasiones diferentes tipos de estrés siguen vías similares para mitigarlos (Mahanjan y Tuteja, 2005).

En el figura 1, se muestra una ruta general de respuesta al el estrés salino, osmótico y bajas temperaturas. En trabajos realizados en *A. thaliana*, se identificaron genes que aumentaban su expresión bajo estrés salino, osmótico y frío (100 mM NaCl, 200 mM Manitol y 4 °C); se encontraron 2409 genes, los cuales mostraban un cambio de 2 veces más la expresión en comparación con plantas control (Kreps *et al.*, 2002). Dentro de este grupo de genes se identificaron 3 diferentes proteínas transportadoras de lípidos, así como un gran número de genes involucrados en la respuesta al estrés.

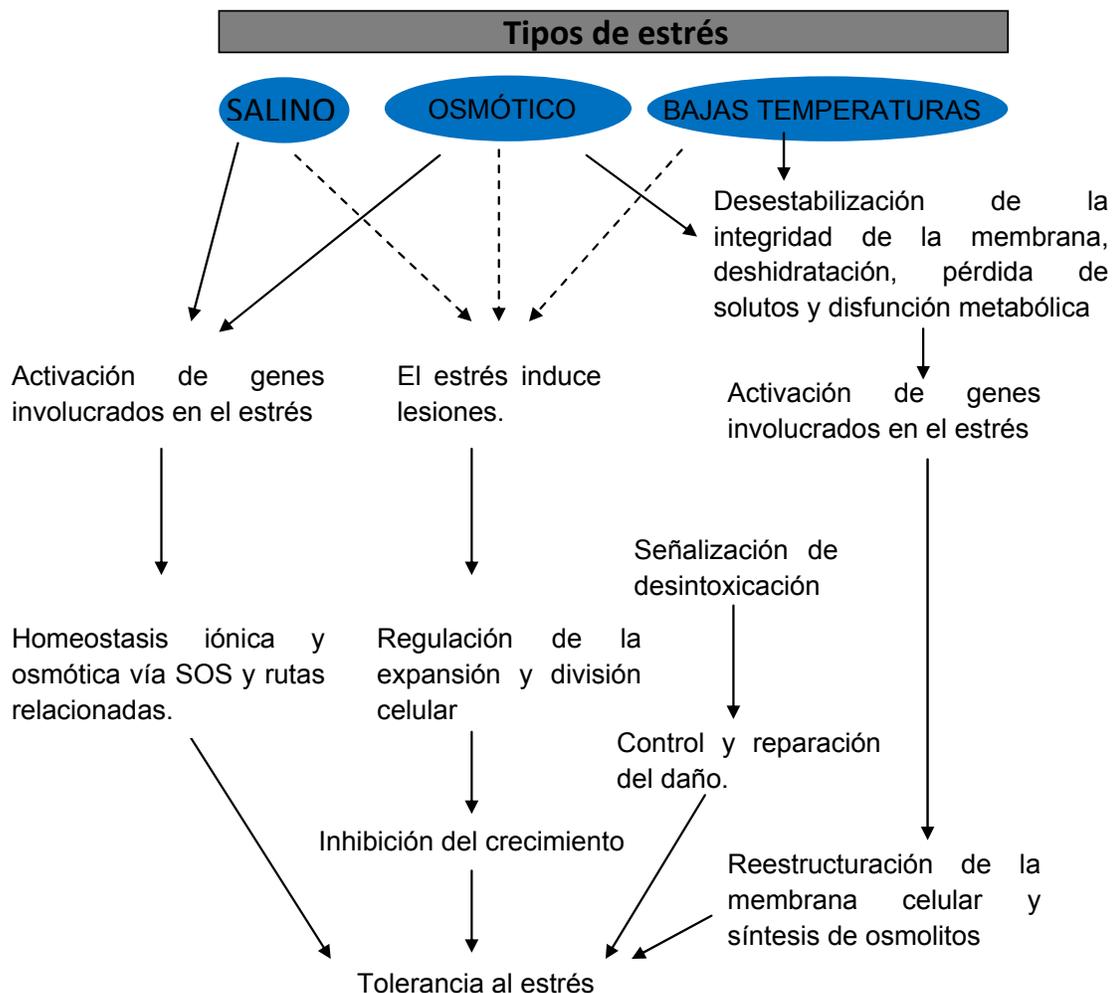


Figura 1. Ruta general de respuesta a el estrés salino, osmótico y bajas temperaturas (diagrama traducido de Mahajan y Tuteja, 2005).

El estrés salino y osmótico es una condición que desencadena procesos de restablecimiento de homeostasis iónica y osmótica para poder llevar una tolerancia al estrés (Liu y Zhu, 1998). Éstos dos tipos de estrés provocan lesiones fisiológicas, celulares y por ende una disfunción metabólica (división celular y crecimiento en la planta) por lo que la planta responde reduciendo la pérdida de

agua, se presentan especies reactivas de oxígeno y se da una detoxificación (Zhu, 2002). El estrés por frío, principalmente ejerce su efecto dañino por la ruptura de la integridad de la membrana y las fugas de soluto (Steponkus, 1984). Como respuesta se presenta restructuración de las membranas celulares y la síntesis de diferentes osmolitos, que sirven para restablecer el metabolismo celular normal.

2.6 Modelos biológicos para estudios de evaluación de genes involucrados en estrés

El estrés genera cambios moleculares y transcripcionales en la planta por lo que actualmente son muy utilizadas plantas simples u organismos sencillos que faciliten la obtención de resultados y la interpretación de los mismos, esto es, el uso de modelos de estudio (Xiong *et al.*, 2002). Tradicionalmente se han utilizado bacterias y levaduras para estudios evaluación de genes bajo estrés abiótico (Yesilirmak y Sayers, 2000). En levaduras se ha logrado caracterizar transportadores de tipo simporter H^+ , canales de K^+ , y transportadores de K^+ , transportadores de sulfato, transportadores K^+/H^+ protón, entre otros péptidos (Yesilirmak y Sayers, 2000). Sin embargo, estos modelos no representan de la mejor manera a la planta desde el hecho que no tienen un aparato fotosintético y con ello las rutas con las que responde una planta al estrés. Como ejemplo se puede mencionar el trabajo de Cosentino (2010), donde al realizar trabajos de evaluación funcional en levaduras de diferentes Antiporter de *Mesembryanthemum cristallinum* y al evaluar el gen *McNhaD* no obtuvo resultados contundentes ya que este es un transportador de tipo antiporter que opera en los plástidos. Un modelo de planta facultativa ampliamente estudiado actualmente es el vidrillo (*Mesembryanthemum cristallinum*) porque esta planta puede crecer a 500 mM de NaCl y se conocen los perfiles de expresión de respuesta (Bohnert *et al.*, 2000). Un importante problema con éste modelo es la inexistencia de líneas mutantes y las dificultades a la hora de realizar análisis genético debido a la variabilidad de la especie y la ploidía de la misma (Adams *et*

al., 1998). Con la secuenciación completa del genoma de *Arabidopsis thaliana* y la existencia de líneas mutantes específicas de una gran cantidad de genes, ésta planta resulta ser el modelo más utilizado para estudios de respuesta al estrés (Borsani *et al.*, 2003).

2.7 Características de *Opuntia streptacantha* ante el estrés abiótico

Existen especies de plantas que poseen características morfológicas y fisiológicas que les permiten sobrevivir y aún crecer en condiciones extremas (Silva *et al.*, 2001). Este tipo de plantas se adaptan y responden al estrés para sobrevivir mediante respuestas moleculares, incluyendo la acumulación de solutos compatibles, producción de proteínas de protección y la expresión de diferentes grupos de genes (Ochoa-Alfaro *et al.*, 2008). En particular los organismos pertenecientes al género *Opuntia* se caracterizan por ser organismos xerófilos; este tipo de plantas ocupa áreas donde hay poca competencia de otras plantas, es decir, crecen en condiciones extremas como son temperaturas extremas y poca disponibilidad de agua (Rebman y Pinkava, 2001). Los nopales mantienen adaptaciones anatómicas y fisiológicas que les permiten desarrollarse en estos lugares como por ejemplo los tallos modificados en forma de cladodios, los cuales mantienen una orientación adecuada para evitar la incidencia durante las horas de mayor intensidad solar mediante la inclinación, de tal manera que solo la menor superficie capte los rayos del sol. También tienen una especialización llamada “apagamiento del metabolismo” (es un estado similar a la hibernación), que ocurre durante las estaciones que presentan condiciones adversas (Nisbet y Patten, 1974). La absorción del agua de lluvia se maximiza debido a la presencia de una amplia red de raíces que se extiende a varios metros de distancia. La retención del agua dentro del cactus se debe a la reducción de las tasas de transpiración a través de: 1) hojas modificadas en espinas, 2) presencia de una capa gruesa de cera cuticular que impide la pérdida directa de agua hacia la atmósfera, 3) el cierre estomático se da durante el día (metabolismo ácido de las

crasuláceas) y 4) el agua se adhiere a los carbohidratos formando un mucilago y de esta manera el agua se libera únicamente mediante la utilización de energía (Rebman y Pinkava, 2001). En relación con la caracterización genética del nopal, ésta ha sido poco explorada y son pocos los trabajos que se han realizado (Bellon, 2009). Dentro de ellos menciona que hay trabajos de extracciones de ADN para la determinación la expresión diferencial de proteínas en pulpa y cáscara bajo diferentes estadios de maduración. Trabajos de ingeniería genética para transferir genes deseables a *Opuntia* (Silos *et al.*, 2002) y algunos otros trabajos para conocer patrones electroforéticos del ARN y patrón de polimorfismos en ADN de diferentes cultivares de nopal (Macias *et al.*, 2004). El grupo de trabajo del Dr. Jimenez-Bremont (Ochoa-Alfaro, 2011) identificó 442 ESTs entre ellas determinó la secuencia del cDNA de una LTP proveniente de un banco de genes de nopal y a caracterizado su funcionalidad en respuesta a estrés abiótico. La secuencia del cDNA de *OpsPTL1* se obtuvo por el ensamble de secuencias obtenidas de la biblioteca de cDNA, la secuencia del gen carece de intrones, la región codificante es de 354 pb que corresponde a un polipéptido de 118 aminoácidos (11.6 kDa) y punto isoeléctrico de 8.87. Analizaron la expresión de los mRNA por estrés abiótico en plantas de nopal de 12 meses de edad bajo los siguientes tratamientos: (1) Tratamiento en condiciones de semi-hidroponía en solución Hoagland con sal (250 mM NaCl) y con sal y calor (250 mM NaCl, 40°C). (2) Tratamiento en tierra: con frío (4°C) y con sequía y calor (no riego, 40°C). Los 2 tratamientos se realizaron durante 17 días, y midieron las cantidades de mRNA por RT-PCR semi-cuantitativa. Los resultados muestran que la expresión del mRNA de *OpsPTL1* se encuentra de forma basal y la expresión aumenta en tratamientos con sal y sal más calor en condiciones de semi-hidroponía, en los tratamientos en tierra los efectos no fueron tan notorios, sin embargo, se observó un aumento en la expresión de mRNA de *OpsPTL1* en estrés por calor y sequía (Gómez-Anduro y Jiménez-Bremont, 2010)

2.8 Proteínas Transportadoras de Lípidos

Las proteínas transportadoras de lípidos o LTPs (por sus siglas en inglés “Lipid Transfer Protein”), llamadas así debido a que poseen la propiedad de transferir lípidos entre membranas (Kader, 1996). Estas han sido descritas en una gran variedad de organismos como: algunos tejidos de mamíferos, plantas, hongos y algunas bacterias. Hasta hace unos años se hipotetizaba que las LTPs se encontraban involucradas en el tráfico intracelular de lípidos (Kader, 1996). Posteriormente esta idea fue desechada debido a que se demostró que las LTPs contienen péptido señal el cual la dirige hacia la región extracelular (Thoma 1993). Hasta estos últimos años a pesar de muchos estudios no existen evidencias claras que permitan sugerir una función específica y por lo tanto las LTPs se encuentran sin obtener una función biológica clara (Carvalo y Gomez, 2007; Kader, 1997; Yeats y Rose, 2007).

Las LTP's generalmente se dividen en dos grandes familias las de tipo 1 (LTP₁) y las de tipo 2 (LTP₂). Las LTP₁ están conformadas de 90 a 95 aminoácidos y las LTP₂ de 70 aminoácidos (Kader, 1996). Las dos familias mantienen 8 residuos de cisteína conservados; la familia LTP₁ tiene la característica de que la Cys₃ se une con la Cys₅₀ y la Cys₄₈ se une con la Cys₈₇, y en el caso de la familia LTP₂ la Cys₃ se une con la Cys₃₅ y la Cys₃₇ se une con la Cys₆₈ (Carvalo y Gomez, 2007) (Figura 2). La estructura secundaria de la familia LTP₁ está compuesta de 4 α -hélices (hélice H₁ de la Cys₃ a la Ala₁₇, H₂ de Ala₂₅ a Ala₃₇, H₃ de Thr₄₁ a Ala₅₆ y H₄ de Ala₆₃ a Cys₇₃) y un largo extremo carboxilo terminal que carece de estructura secundaria, excepto por la presencia de una vuelta hélice (Lee *et al.*, 1998). La familia LTP₂ sigue los mismos patrones de estructura secundaria como la familia LTP₁, pero presenta tres α -hélices (H₁ de Cys₃ a la Ala₁₆, H₂ de la Thr₂₂ a la Ala₃₁ y la H₃ de Gln₃₃ a la Ala₄₀) y una región que contiene 2 simples vuelta hélice (Tyr₄₅ a Tyr₄₈ y Ala₅₄ a Val₅₈) y el extremo carboxilo terminal no presenta ninguna estructura secundaria definida (Samuel *et al.*, 2002).

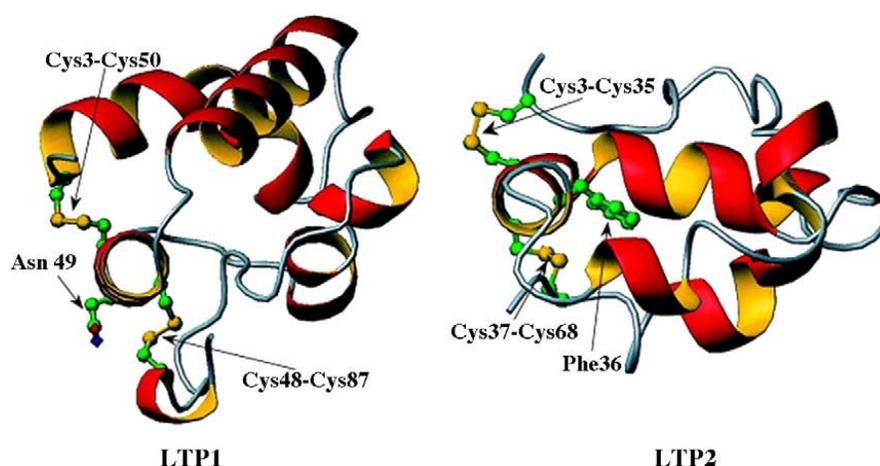


Figura 2. Orientación de la cadena de la familia LTP₁ y LTP₂ (tomada de Samuel *et al.*, 2002). Espirales en rojo y amarillo representan hélices alfa, los cordones blancos representan lazos y los aminoácidos cisteína (Cys), fenilalanina (Phe) y asparagina (Asn) están representados en bolas y varillas (verde/amarillo)

2.9 Expresión de LTP's

Arondel *et al.* (2000) encontró que las LTP's de *A. thaliana* son una familia multigénica compuesta de 15 genes y cada uno de ellos se expresa de manera tejido específico, aunque todos ellos se expresan en flores y silicuas, en raíces no se ha demostrado su expresión. Se sabe que las LTP1, LTP5, LTP2 y LTP6 se expresan en hojas y que las LTP4 y LTP3 son altamente inducidas por la presencia de ABA; además que LTP1 y LTP2 se encuentran en tándem en el cromosoma 2, LTP3 y LTP4 se encuentran en el cromosoma 5, LTP5 y LTP12 en el 3, LTP7, LTP8 y LTP9 dispersos en el cromosoma 2 y el resto disperso en todo el genoma. En el 2010 Chae *et al.*, publicaron que al realizar un análisis de expresión en LTP1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 mediante una fusión de sus regiones promotoras con el gen reportero B-Glucoronidasa (GUS) encontraron que la expresión de éstas se dá de manera tejido específico, como se muestra en la siguiente tabla (Tabla I).

Tabla I. Expresión tejido específico de 7 LTPs de *A. thaliana* (Modificado de Chae *et al.*, 2010).

	Tejido vegetativo	Tejido floral
AtLTP1	Punta de la raíz, Raíces laterales, hipocotilo, ápice del brote, cotiledones y hojas.	Anteras, filamentos, estigma, estilo, sépalos y pétalos.
AtLTP2	Hipocotilo y ápice del brote.	
AtLTP3	Punta de la raíz, raíces laterales, hipocotilo y brote del ápice.	Filamentos, óvulos y sépalos
AtLTP4	Raíces laterales, hipocotilo Ápice del brote, células guarda y borde de la hoja.	Estilo y sépalos
AtLTP5	Punta de la raíz, Raíces laterales, hipocotilo, ápice del brote, borde de la hoja, células guarda y venas.	Polen, estilo, sépalos y pétalos.
AtLTP6	Raíces laterales, hipocotilo, brote del ápice, borde de la hoja, células guarda, venación, tricomas.	Estilo, ovulos y sépalos.
AtLTP7	Hipocotilo, brote del ápice, borde de la hoja, células guarda, tricomas.	Anteras, filamentos,

Se ha reportado que las proteínas transportadoras de lípidos están envueltas en respuesta a diversos tipos de estrés. Wang *et al.* (2009) hipotetizó que la expresión de la LTPs constituyen una respuesta adaptativa al estrés abiótico, ya que ellos observaron que la expresión de al menos 14 LTPs de *Tamarix hispida* se veía modulada en respuesta a NaCl, Polietilen Glicol (PEG), NaHCO₃, CdCl₂ y Ácido Abscísico (ABA) en raíz, brote y hoja. Por otra parte, Huang *et al.*, (2008) describen algunos genes que presentan comunicación cruzada, es decir,

aumentan su expresión bajo diferentes tipos de estrés abiótico, como lo puede ser la sequía, el frío, la salinidad así como los tratamientos con ABA, como por ejemplo LTP3 y LTP4 de *A. thaliana*, así como algunos otros genes de respuesta a estrés.

2.10 Posibles funciones de las proteínas transportadoras de lípidos en plantas

Se ha especulado sobre las posibles funciones de las LTPs, dentro de ellas podemos mencionar: la formación de capas de cutina y cera cuticular en las hojas, reguladoras del desarrollo celular en las plantas necesarias para la adhesión del polen durante los procesos reproductivos, así como también durante condiciones de estrés abiótico como: bajas temperaturas, choque térmico, sequía y salinidad (Yeats y Rose., 2007).

Las partes aéreas de todas las plantas terrestres están cubiertas por una estructura llamada cutícula. Los lípidos precursores de la cutícula son sintetizados en las células epidermales y deben de pasar a través de la pared celular hidrofílica para el desarrollo de la cutícula. Por ello, las LTPs han sido propuestas como los transportadores de estos compuestos, aunque no hay evidencia clara que lo sustente, solamente se ha observado una correlación en la acumulación de cera y la expresión de estas LTPs (Cameron *et al.*, 2006).

Se propone que las LTPs también se encuentran involucradas en el crecimiento vegetativo, reproductivo y en el desarrollo. Park *et al.* (2002) reportaron LTPs de lirio y demostraron que estas son necesarias, junto con polisacáridos de pectina, para que se diera la adherencia del tubo polínico en una matriz estilar artificial. Un evento similar sucedió cuando Chae *et al.* (2009) al trabajar con plantas de *A. thaliana* mutantes del gen *AtLTP5* encontraron organismos con retrasos en el crecimiento del tubo polínico y disminución en el número de huevos fertilizados,

por lo que concluyeron que esta proteína juega un papel importante en la reproducción.

2.11 LTP's en respuesta a estrés abiótico

Estudiando plantas de *Prosopis juliflora*, Geroge y Parida (2010) observaron que los niveles de expresión de PjLTP1 aumentan debido a estrés por sequía y estrés oxidativo. Ellos proponen que la PjLTP1 podría estar involucrada en la eliminación de especies reactivas de oxígeno. Al analizar su región promotora del gen PjLTP1 encontraron elementos regulatorios en respuesta a estrés por bajas temperaturas, sequía y algunos otros regulados por ABA.

Torres-Schumann *et al.* (1992) reportaron que la expresión de una LTP se encontraba regulada por estrés abiótico (estrés salino, alta temperatura, osmótico y ABA). Ellos reportaron un polipéptido de 114 aminoácidos en plantas de tomate al que llamaron TSW12, y sugieren que la inducción de expresión de esta proteína en estrés abiótico podría deberse a que ésta contribuye a la reparación de los daños producidos por el estrés en las membranas. También sugieren que probablemente estas proteínas puedan producir cambios en la composición lipídica de las membranas para regular la permeabilidad a los iones tóxicos y su fluidez en condiciones de altas temperaturas.

Qin *et al.* (2011), trabajando con plantas de *Phalaenopsis amabilis* que sobre-expresan el gen de una LTP de *Oriza sativa*, observaron que estas plantas presentaban mayor tolerancia a bajas temperaturas que plantas control. Igualmente encontraron que las plantas transgénicas presentaron mayor actividad antioxidante (por superóxido dismutasa) durante el estrés y una menor peroxidación de lípidos en la etapa de recuperación en comparación con las plantas control. Dichos autores proponen que la LTP modifica la composición de la membrana celular, modificando su permeabilidad y de esta manera evita la oxidación celular durante estrés por bajas temperaturas (Qin *et al.*, 2011). Bubier (2004) menciona que una posible LTP de *A. thaliana* aumentaba su expresión por

frío que resulta en la protección durante la congelación, posiblemente a través de la modificación de la membrana celular o de la pared celular vegetal. El mismo autor observó también que su expresión aumenta durante periodos de luz largos y que la activación de la expresión es dependiente de calcio. Hinch (2002) propone que las LTPs funcionan como Crioprotectinas en las membranas tilacoidales y esto hace que las membranas no se vean afectadas por temperaturas congelantes.

Hollenbach *et al.* (1997) trabajando con plantas de cebada que fueron expuestas a Cadmio, y Cameron *et al.* (2006) trabajando con plantas de *Nicotiana glauca* sometidas a exposiciones periódicas de sequia, encontraron un aumento en ceras cuticulares y en la expresión de una LTP. Ambos autores proponen que la LTP participa en el ensamble de la cera cuticular de estas plantas. De esta manera las plantas pueden evitar el contacto directo con contaminantes así como también la pérdida de agua por medio de las hojas, ya que la cera forma una barrera entre la epidermis y la atmósfera. Yubero-Serrano *et al.* (2002) a partir de una biblioteca sustractiva por supresión de plantas de fresa sometidas a la aplicación de ABA, identificaron una secuencia de LTP que se induce bajo esta hormona, por lo que sugiere que esta proteína es altamente regulada por estrés abiótico y por lo tanto se encuentra involucrada en mecanismos de respuesta al estrés abiótico.

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales retos en la agricultura son los problemas generados a partir de malas prácticas agrícolas así como del medio ambiente en donde los cultivos se desarrollan. Resulta interesante tratar de conocer cuáles son los mecanismos por medio de los cuales las plantas hacen uso para poder evitar y/o contrarrestar los efectos perjudiciales que las afectan. Sin duda alguna es importante realizar investigación enfocada en tratar de dilucidar qué es lo que sucede a nivel molecular y celular en las plantas. En la actualidad se desconoce en gran medida la funcionalidad de genes que provienen de organismos que están adaptados a medios ambientes extremos tal es el caso de *Opuntia streptacantha*. Es por ello que el presente trabajo pretende aportar información respecto al gen (*OpsLTP1*) que codifica para una Proteína Transportadora de Lípidos de *Opuntia streptacantha*. Otro punto interesante, es que se desconoce en gran medida las funciones de las LTPs. En últimos años se ha logrado identificar funciones a una gran cantidad de genes mediante el uso de organismos modelo como lo es *S. cerevisiae* y *A. thaliana*, mediante técnicas de genética reversa y genética dirigida, por lo cual en el presente trabajo se realizaron ensayos de funcionalidad con *S. cerevisiae* sobre-expresantes del gen de *OpsLTP1*, así como con una línea mutante insercional de ADN-T de una LTP de *A. thaliana* y la sobre-expresión del gen *OpsLTP1* en *A. thaliana* y evaluar su funcionalidad bajo diferentes tipos de estrés abiótico.

4. HIPÓTESIS

Si el gen *OpsLTP1* de *O. streptacantha* regula su expresión en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico, entonces, al ser sobre-expresado en *A. thaliana*, se obtendrán líneas transgénicas con una mayor tolerancia a determinado estrés abiótico. Además, al estudiar líneas mutantes insercionales de *A. thaliana*, de un gen ortólogo (*AtLTP3*) al gen de nopal se obtendrán líneas mutantes con una menor tolerancia determinado estrés abiótico, y por lo tanto se observaran cambios fenotípicos ante determinado estrés abiótico.

5. OBJETIVOS

5.1 *Objetivo general*

Caracterizar funcionalmente el gen *OpsLTP1* que codifica para una proteína transportadora de lípidos de *Opuntia streptacantha*.

5.2 *Objetivos particulares*

- Caracterizar bioinformáticamente el gen *OpsLTP1*.
- Evaluar la funcionalidad del gen *OpsLTP1* en *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A bajo estrés abiótico.
- Generar líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobre-expresen el gen *OpsLTP1*.
- Caracterizar líneas mutantes homocigotas insercionales de T-DNA del gen *AtLTP3* de *Arabidopsis thaliana* el cual es el ortólogo del gen *OpsLTP1* y líneas sobre-expresantes del gen *OpsLTP1* en estrés abiótico.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Materiales Biológicos

Escherichia coli : *E. coli* TOP 10 F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str^R) endA1 λ -

Agrobacterium tumefaciens: *A. tumefaciens* GV2260

Saccharomyces cerevisiae: *S. cerevisiae*. W303-1A strain (MAT α leu2-3, 112 ura3-1 trp1-1 his3-11, 15 ade2-1)

Arabidopsis thaliana: *A. thaliana*, ecotipo Columbia

Línea Mutante SALK_095248 por inserción de ADN-T; Con fondo genético Col-0, del SALK Institute (La Joya EE.UU.)

6.2 Plásmidos

pYES2.1 TOPO® (Invitrogen No. K415001) TA Expression Kit., (Figura 3). Contiene promotor Gal-1, promotor T-7, sitio de clonación TOPO®, epítipo V5, Terminador CYC1, Origen pUC, gen de resistencia a ampicilina, Gen URA-3, origen 2 μ y un origen f1.

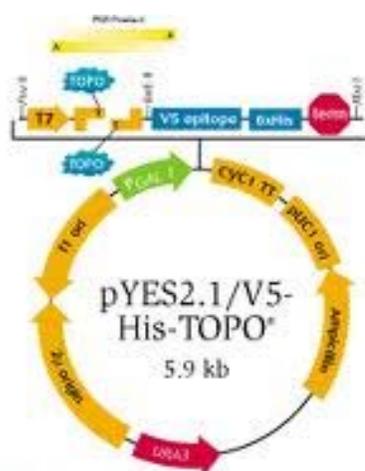


Figura 3. Mapa físico del vector pYES2.1/V5-His-TOPO®

pCR®8/GW/TOPO® TA Cloning Kit. (Invitrogen No. K250020) : (Figura 4) Contiene sitios attL para recombinación en diferentes vectores destino tipo Gateway, gen de resistencia a Spectinomycin y 1 origen de replicación.

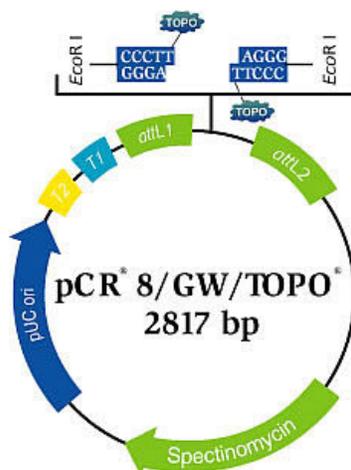


Figura 4. Mapa físico del vector pCR/8/GW/TOPO®

pMDC32 Gateway™ Compatible Plant Transformation Vector: (Figura 5) Proviene del vector pCambia, contiene: Secuencias de recombinación attR1 y AttR2, Casete de resistencia a Kanamicina en bacterias, Casete de resistencia a Higromicina B, Promotor de expresión 35S 2X *CaMV*, Terminador nosT, borde derecho e izquierdo para recombinación.

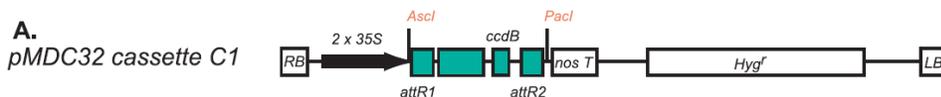


Figura 5. Mapa físico del vector pMDC32 (tomado de Curtis y Grossniklaus, 2003).

6.3 Métodos

6.3.1 Métodos bioinformáticos

A partir de la secuencia de *OpsLTP1* que fué proporcionada por el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas y Hongos del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), se realizó análisis de Identidad con el algoritmo Blastn, Protein utilizando la página de SALK Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) para conocer las posibles secuencias de genes ortólogos en *A. thaliana*. Posteriormente se realizó un alineamiento múltiple para conocer con cuál de las secuencias compartía mayor identidad, utilizando la página del Instituto europeo de Bioinformatica EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>). Para conocer los regímenes de expresión bajo diferentes condiciones de estrés abiótico, de la secuencia que mostró mayor identidad se consultó la pagina de AtGenExpress Visualization Tool (AVT) (<http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp>). Para identificar en que tejido y estado fenológico de la planta se presentan los mayores valores de expresión se utilizó la herramienta BAR (por sus siglas en inglés: The Bio-array Resource for Plant Biology) de la Universidad de Toronto (<http://bar.utoronto.ca/welcome.htm>). Se obtuvo la secuencia correspondiente a 2000 nucleótidos corriente abajo del gen del probable gen ortólogo de *A. thaliana*, en la página Phytozome (<http://www.phytozome.net/>). Se realizó un análisis bioinformático de los 2000 nucleótidos corriente abajo correspondiente a la región regulatoria del probable gen ortólogo de *A. thaliana* en la pagina Cis-Actin Regulatory Elements PLANT (CARE) (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>).

6.3.2 Cultivo de *S. cerevisiae*

Las levaduras sin transformar se crecieron en medio YPD (1% extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de dextrosa) en el caso de medios sólidos se agregó 1.5% de agar.

Las levaduras se crecieron en medio YNB, medio mínimo SD (0.67% de medio YNB, sin aminoácidos 2% de glucosa y 2% de Sacarosa). Los aminoácidos (Leucina, Histidina y Triptófano) y la base nitrogenada (Adenina) se emplearon para suplir las auxotrofias de la cepa W303-1A, de esta manera se llevó a cabo la selección Ura⁺ en el medio deficiente de uracilo. La concentración de antibiótico usado fue 100 mg/ml de Ampicilina. (Como lo indica el proveedor pYES2.1 TOPO® TA Expression Kit).

6.3.3 Cultivo de *E. coli*

El crecimiento se realizó en medio de cultivo Luria Bertani (LB) líquido a 37°C, 150 rpm, y su crecimiento se monitoreo realizando mediciones de su densidad óptica a 550 nm, para los cultivos sólidos se utilizo LB con 1.5% de agar.

Las concentraciones de los antibióticos usados en cada caso fueron: 100 mg/ml Ampicilina, 100mg/ml espectinomicina y 50mg/ml Kanamicina (Sambrook y Russell, 2001).

6.3.4 Cultivo de *A. tumefaciens* GV2260

Estas bacterias fueron crecidas en medio LB Líquido a 28°C, 150 rpm, el crecimiento fue monitoreado realizando mediciones de su densidad óptica a 550 nm. Para los cultivos sólidos se utilizo LB/1.5% de agar, para aquellas líneas que fueron transformadas el medio fue suplementado con: 100mg/ml de Kanamicina/50 mg/ml de rifampicina/50 mg/ml de Kanamicina.

6.3.5 Cultivo *in vitro* de *A. thaliana*

Para el cultivo *in vitro*, las semillas de *A. thaliana* se desinfectaron en etanol al 75% se agitaron por 2 minutos, se centrifugaron a 2000 rpm por 2 min y se retiró el sobrenadante. Posteriormente se agregó 1 ml de solución de lavado (40% cloro, 0.02% Triton esteril), se agitaron por 15 min constantemente se centrifugaron y se retiró el sobrenadante. Luego, se realizaron 7 lavados con 1 ml agua destilada estéril agitando por 10 min constantemente, se centrifugó y se retiró el sobrenadante. Finalmente, se guardaron las semillas a 4°C por 2 a 3 días en oscuridad (para sincronizar la germinación). Para la germinación de semillas de *A. thaliana* se utilizaron placas con medio MS al 50%, agar al 1.5% y 1.5% de agarosa, se acomodaron semillas a una distancia aproximada de 0.5 cm. Las placas conteniendo las semillas, se transfirieron a la cámara bioclimática con fotoperiodo de 16/8 h a 25+2 °C y 55/75 + 5 % HR (día/noche) con una intensidad de luz (80 $\mu\text{mol m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$).

6.3.6 Cultivo de *A. thaliana* en sustrato sólido

Las plántulas se trasplantaron una vez que presentaron sus primeras hojas verdaderas (aproximadamente de 10 a 15 días). Se transfirieron a tierra (Sun Shine 50%, perlita expandida 25% y vermiculita 25%) utilizando pinzas de disección. Las macetas se cubrieron con una bolsa de plástico para evitar la deshidratación. Se retiró la bolsa después de una semana. Las plantas se regaron cada tercer día (alternando un riego con agua destilada y el siguiente con agua enriquecida con fertilizante Peters).

6.3.7 Clonación en el vector pYES2.1

Se realizó bajo los parámetros que marca el proveedor utilizando: 3 µl de producto de PCR fresco, se adicionó 1 µl de solución salina diluida, 1 µl de agua estéril y 1 µl de vector pYES2.1 TOPO®. Luego se mezcló suavemente la reacción y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Se almacenó a -20 °C para usos posteriores..

6.3.8 Clonación en el Vector pCR8GW TOPO TA Cloning

Se realizó mediante los lineamientos que marca el producto PCR®8/GW/TOPO® TA Cloning® Kit, y que a continuación se describe: En un tubo Eppendorf de 0.6 ml se adicionaron 3 µl de un producto fresco de PCR, 1 µl de solución salina diluida, 1.5 µl de agua milli Q y finalmente se agregó 0.5 µl de vector; se mezcló suavemente la solución y se dejó incubando durante toda la noche a temperatura ambiente. Para los posteriores usos la reacción se almacenó a -20 °C.

6.3.9 Recombinación

Las construcciones genéticas para la modificación genética de plantas se realizaron bajo la plataforma Gateway, esta aprovecha las propiedades de recombinación específica del bacteriófago lambda el cual reconoce los sitios específicos, por lo que a partir de un vector de entrada (pCR8GW® TOPO TA® Cloning INVITROGEN) fue necesario realizar recombinación por medio de la enzima LR. La enzima BP clonasa recombina los sitios *att* B con los sitios *att* P y la enzima LR clonasa recombina los sitios *att* L con los sitios *att* R. esta reacción se realizó bajo el protocolo que recomendado por: Gateway® LR Clonase® II Enzyme Mix. INVITROGEN. Que a continuación se describe:

La reacción se realizó en tubo Eppendorf de 1.5 ml en el que se agregaron aproximadamente 150 ng de la construcción *pCR8GW::OpsLTP1*, mas 150 ng del vector destino y se llevó a un volumen total de 8 µl con buffer TE. Posteriormente

se agregaron 2 μ l de la enzima LR clonasa II, se agitó con vortex a baja velocidad y la reacción se dejó incubando toda la noche a temperatura ambiente. Para terminar la reacción se agregó 1 μ l de proteinasa K y se incubó a 37 °C por 10 min para inactivar las enzimas de recombinación.

6.3.10 Transformación

6.3.10.1 Preparación de células electrocompetentes de *E.coli*

Una colonia aislada de *E. coli* de la cepa TOP 10 se inoculó en 5 ml de medio LB, se dejó crecer toda la noche a 37°C y 150 rpm. Posteriormente se inocularon 500 ml de medio LB con 2.5 ml del medio anterior y se incubaron a 300 rpm 37°C hasta una OD₆₀₀ ~0.5 a 0.6. Las células se enfriaron en hielo por 10 a 15 min y se transfirieron a tubos de centrifuga previamente enfriados. A continuación los cultivos se centrifugaron por 20 min a 4200 rpm y 2°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 5 ml de agua destilada estéril y fría. Se añadieron 500 ml de agua fría y se centrifugaron las células nuevamente con las condiciones antes mencionadas. Se realizó un segundo lavado. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 40 ml de glicerol frío al 10%. Luego, se centrifugó por 10 min. a 4200 rpm y 2 °C. Por último se estimó el volumen del botón celular y se resuspendió en el mismo volumen de glicerol al 10%. Se repartieron alícuotas de 50 μ l en tubos eppendorf estériles previamente enfriados en un block y se almacenaron a -80 °C hasta su posterior uso (Sambrook y Russell, 2001)

6.3.10.2 Transformación de *E.coli*

Se descongeló un vial de células electrocompetentes (50 μ l) en hielo y la suspensión de células se transfirió a una cubeta de electroporación de 0.2 cm previamente enfriada. Se agregaron entre 10 y 20 ng de ADN en un volumen no mayor de 2 μ l, se incubó la mezcla por 5 min en hielo, y se electroporó a 25 μ F de capacitancia, 2.5 kV y 200 ohm de resistencia, por 5 s. Inmediatamente después se les adicionó medio LB a temperatura ambiente y se llevó a incubación por 1 h a 37 °C a 150 rpm. Por último se sembró por dispersión en placas de agar LB con el respectivo antibiótico de selección para las colonias transformadas.

6.3.10.3 Preparación de células competentes de *S. cerevisiae*

Para la preparación de *S. cerevisiae* competentes se siguieron las especificaciones del Kit *S. c.* EasyComp™ Transformation Kit, (Invitrogen™ Life technologies): Se utilizó una colonia aislada de *S. cerevisiae* que fue inoculada en medio YPD y crecida toda la noche a 28°C a 250 rpm. Se determinó la OD₆₀₀ del cultivo el cual se debe de encontrar a una densidad óptica de entre 3.0 y 5.0. Posteriormente se diluyeron las células del cultivo a una densidad óptica de 0.2 a 0.4 OD₆₀₀ en un volumen de 10 ml de medio YPD y se crecieron las células a 28°C a 250 rpm hasta alcanzar una densidad óptica de 0.6 a 1.0 (aproximadamente entre 3 y 6 horas). Luego se centrifugaron a 1500 rpm por 5 min a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla celular en 10 ml de solución I (Solución de lavado), se centrifugó a 1500 rpm a temperatura ambiente y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla celular en 1 ml de solución II (Solución Catiónica de litio para hacer células competentes). Por último las células competentes se distribuyeron en alícuotas de 50 μ l en tubos Eppendorff para ser almacenadas a -80 °C hasta su posterior uso.

6.3.10.4 Transformación de *S. cerevisiae*

La transformación de levaduras se realizó bajo los parámetros del Kit *S. c.* EasyComp™ Transformation Kit, descrito por el proveedor, Invitrogen™ Life technologies. En este caso se descongelaron 50 µl de células competentes, se agregaron 5 µg del ADN plasmídico y se agregaron 500 µl de solución III (solución de transformación). Luego se mezclaron con las células y se agitaron vigorosamente en vortex. A continuación se incubó la reacción de transformación a 30°C por 1 h en baño de agua. Posteriormente la reacción se mezcló vigorosamente en vortex cada 15 min. Por último, la solución de células se inoculó por dispersión en placas con medio LB y 100µg/ml de Ampicilina.

6.3.10.5 Preparación de Células Electrocompetentes de *A. tumefaciens* (Tomado de Lin, 1995 y Main et al, 1995)

Se inocularon 1.5 L de medio extracto de levadura manitol (YM) en un matraz Fembach con una alícuota de un cultivo de *A. tumefaciens* en fase logarítmica de crecimiento. Se incubaron a 30 °C con agitación (300 rpm) toda la noche hasta tener una densidad 5 - 10 x 10⁷ células/ml que equivale a una OD_{nm} 0.5 - 0.7. Se decantaron las células en botes de 500 ml y se centrifugaron a 3000 x g por 10 min a 4 °C, después cuidadosamente se tiró el sobrenadante y se pusieron los botes de centrifuga con la pastilla celular en hielo. Se agregaron 50 ml de glicerol al 10% frío y estéril (en agua milliQ) a cada uno de los botes, se agitó con vortex para resuspender la pastilla celular y se llevó a un volumen de 500 ml cada uno de los botes con la solución de glicerol frío y estéril al 10%. Se centrifugó a 3000 x g por 10 min a 4 °C, se removió el sobrenadante, se resuspendió y lavó como en el paso anterior. Cada una de las pastillas celulares se resuspendió en 5 ml de la solución fría y estéril de glicerol al 10%. Luego se transfirió a tubos de Oakridge de 30 ml fríos, se centrifugó a 3000 x g por 5 minutos a 4 °C y se removió el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en una solución estéril y fría de sorbitol 1 M (Lin, 1995), o también se utilizó glicerol al 10% (Main et al, 1995). Con

ello se obtuvieron aproximadamente 1.5 ml de células en concentración aproximada de 5×10^{10} células/ml. Se hicieron alícuotas de 50 μ l en tubos para microcentrifuga estériles de 1.5 ml y se congelaron en un baño de isopropanol en hielo seco para almacenarse a -70 °C.

6.3.10.6 Electroporación de *A. tumefaciens* (Modificado de Main et al., 1995 y Shaw, 1995)

Se descongelaron células electrocompetentes de *A. tumefaciens* (cepa LBA 4404) en hielo. Se electroporaron las bacterias con las siguientes condiciones: 25 μ F, 2.5 kV y 200 Ω . Se usaron 2 μ l de ADN plasmídico (miniprep) para 50 ml de bacterias, se mezcló cuidadosamente y se transfirió a una cubeta para electroporación previamente enfriada. Se secaron los extremos y se colocó la cubeta en el electroporador para dar un pulso eléctrico. Inmediatamente se agregó 1 ml de medio SOC (Invitrogen) a temperatura ambiente y se incubaron las bacterias de 2 a 3 horas a 30 °C a 300 rpm. Finalmente se plaquearon alícuotas de las células electroporadas en placas de YM con los antibióticos adecuados (Rifampicina 50 mg/ml y Kanamicina 50 mg/ml) y se incubaron a 48 h a 30 °C.

6.3.10.7 Transformación de *A. thaliana* mediante *A. tumefaciens*

Se realizó el método de transformación mediado por *A. tumefaciens* utilizando la técnica de Inmersión floral, descrito por Zhang et al. (2006). Se esterilizaron y colocaron semillas en medio MS y a continuación las semillas se estratificaron manteniéndolas en oscuridad por 2 días a 4°C. Para la germinación, las semillas se mantuvieron en condiciones de días largos (16 h luz/8 h oscuridad a 25°C) por dos semanas y después se transfirieron (16 semillas por maceta) a suelo húmedo (Vermiculita: perlita: Sun Shine 1:1:3) con fertilizante Peters (9 N :45 P :15 S). Éstas plantas fueron crecidas en cámaras bioclimáticas en condiciones de días largos para inducir la floración por 3 a 4 semanas. Una vez desarrolladas las

inflorescencias, se retiraron las flores maduras y silicuas, dejando exclusivamente yemas florales.

Por otra parte, la preparación de las cepas de *A. tumefaciens* que contenían el gen de interés en el vector binario se incubaron en 5 ml de medio LB por 2 días a 28°C. A partir de éste cultivo se inocularon 500 ml de medio LB/ 50µg/ml Rifampicina/ 50µg/ml Kanamicina/ 100µg/ml de Ampicilina. Se creció el cultivo de 16 a 18 h a 28°C y se detuvo el crecimiento cuando la OD₆₀₀ era de ~1.5 a 2.0, es decir cuando se encontraba en la fase estacionaria. Las células se cosecharon a temperatura ambiente por centrifugación 4,000 g por 10 min. y se resuspendieron en un volumen similar de medio MS y sacarosa al 5%. Se le adicionó 0.02% de Silwet L-77 e inmediatamente se realizó la inmersión floral de las plantas por 7 segundos con agitación gentil. Rápidamente se retiraron de la solución y todas aquellas inflorescencias que no presentaron una película de la solución en la superficie se humedecieron de manera individual con una pipeta. Posteriormente, las plantas se cubrieron para evitar la deshidratación y mantener una alta humedad y se colocaron de manera horizontal en obscuridad durante 48 h. Después de 7 días de la primera inmersión las plantas fueron sumergidas en la solución conteniendo el *A. tumefaciens* durante 10 s como se describió anteriormente. Finalmente las plantas se crecieron en cámara bioclimática por 1 mes para obtener silicuas maduras (de color café) y se cosecharon para seleccionar organismos transformados.

6.3.11 Tamizaje de semillas transformadas

Para la selección de semillas transformadas primeramente se realizó la desinfección de semillas como se indica en el apartado de “Cultivo *in vitro* de *A. thaliana*”, posteriormente las semillas se sincronizan por un plazo de 2 días a 4°C. Posteriormente en placas, con medio MS al 50%/ 1.5% agar/ 1.5% de sacarosa/50 µg/ml higromicina B, se acomodaron semillas a una distancia aproximada de 0.5

cm. Las placas conteniendo las semillas se transfirieron a la cámara bioclimática con fotoperiodo de 16/8 h a 25±2 °C y 55/75 ± 5 % HR (día/noche) con una intensidad de luz (80 μmol m⁻².s⁻¹) por 7 días. A continuación se transfirieron a tierra (Sun Shine 50%, perlita expandida 25% y vermiculita 25%) utilizando pinzas de disección. Las macetas se cubrieron con una bolsa de plástico para evitar la deshidratación. Se retiró la bolsa después de una semana. Las plantas se regaron cada tercer día (alternando un riego con agua destilada y el siguiente con agua enriquecida con fertilizante Peters) hasta la obtención de semillas maduras (2-3 meses).

La evaluación de la expresión del gen de *OpsLTP1* en *A. thaliana* se hizo por PCR cuantitativa (qPCR) utilizando 1 μl de cDNA proveniente de una reacción con 1 μg de RNA total y el reactivo SsoFastEvaGreen (Bio-Rad). El cDNA se preparó utilizando RNA total extraído de 6 plantas provenientes de 3 líneas diferentes de “Over *OpsLTP1*”. Se utilizó la transcriptasa reversa IMPROM II (Promega) siguiendo las especificaciones del proveedor. La reacción de qPCR se llevó a cabo en un termociclador (Rotor-Gene 6200-HRM, Corbett-Research) bajo las siguientes condiciones: Incubación inicial a 95°C por 2 min, seguido de 40 ciclos de 94°C por 10 s, 60°C por 20 s y 72°C por 30 s. La fluorescencia se leyó al final de cada ciclo a los 72°C. Se realizó una extensión final de 5 min a 72 °C y se realizó una curva de desnaturalización para confirmar la identidad de los productos formados (70-90°C). La reacción se realizó por duplicado y los resultados se normalizaron con el factor de elongación (EF1) de *A. thaliana* tomados de Lilly *et al.* (2011) y cuyas secuencias son: At5g60390EF1F (5'-CAC CAC TGG AGG TTT TGA GG-3') y At5g60390 EF1 R (5'- TGG AGT ATT TGG GGG TGG T-3'). Los resultados se analizaron con $2^{-(\Delta Ct)}$ y se expresaron en unidades relativas de mRNA de la proteína transportadora de lípidos (*OpsPT1L*)/EF1. Los primers utilizados para cuantificar la PTL fueron: *OpsLTP1*qPCRfor (5'- CCT CGG CCG ATC GGA AAA C- 3') y *OpsLTP1*qPCRrev (5'-GAC CTG GAA TAG TAC CAG CAG-3')

6.3.12 Extracción de ADN plasmídico por el Método de Lisis Alcalina (Modificado de Sambrook y Russell, 2001)

Se tomaron 1.5 ml del cultivo bacteriano transformado con el plásmido de interés y se centrifugó 5 minutos a 12 000 x *g* a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 250 μ l de solución I (50 mM glucosa/ 25 mM Tris-Cl (pH 8)/ 10 mM EDTA (pH 8)). Se agregaron 250 μ l de la solución II (0.2 N NaOH/ 1% SDS (p/v)) y se incubó de 4 a 10 minutos hasta que la solución se tornó de transparente a clara. Se añadieron 250 μ l de solución III (para 100 ml: 60 ml de 5 M de acetato de potasio/ 11.5 ml de Ácido acético glacial/ 28.5 ml agua) fría (4 °C) y se incubó en hielo de 10 a 15 minutos. Se centrifugó 10 minutos a 12 000 x *g* a temperatura ambiente y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio para agregar 700 μ l de isopropanol. El ADN se precipitó a -80 °C por una hora y se centrifugó 10 minutos a 12 000 x *g* a temperatura ambiente. Se removió el sobrenadante y se lavó el pellet 2 veces con 300 μ l de etanol al 70%. Se centrifugó 2 minutos a 12 000 x *g* a temperatura ambiente y se removió el etanol por decantación teniendo cuidado de no perder el ADN presipitado. Se secó al vacío y se resuspendió en 50 μ l de TE. Para los plásmidos que fueron mandados a secuenciar, se purificaron mediante el siguiente procedimiento: Una vez resuspendido el ADN plasmídico en SE TE llevó a un volumen de 200 μ l con H₂O destilada estéril y se colocó en un tubo para microcentrifuga de 1.5 ml. Se agregó un volumen equivalente de solución de Sevag (Cloroformo: Alcohol isoamílico, 24:1) y se mezcló suavemente en el vortex hasta formar una emulsión opaca. Luego se centrifugó a 12 000 x *g* durante 7 minutos, se tomó la fase acuosa con el ADN plasmídico y se transfirió a un tubo de 1.5 ml. Se repitió el lavado con solución Sevag. Se agregó un volumen equivalente de isopropanol y se preprecipitó a -80 °C por una hora o a -20 °C toda la noche. Se removió el sobrenadante y se lavó el botón celular con 300 μ l de etanol al 70%. Posteriormente, se centrifugó 2 minutos a 12 000 x *g* a temperatura ambiente y se

removió el etanol por decantación teniendo cuidado de no perder la pastilla celular. Se repitió el lavado con etanol como en el paso anterior, se secó la pastilla a temperatura ambiente y resuspendió en 30 μ l H₂O milli Q.

6.3.13 Aislamiento de ADN genómico

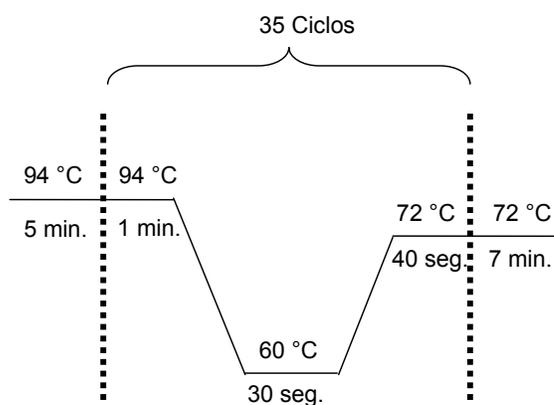
El aislamiento de ADN de plantas se realizó bajo el protocolo descrito por Weigel y Glazebrook (2002) donde 100 mg de tejido fresco de planta fueron colocados en tubos Eppendorf de 1.5 ml y congelados en N₂ líquido. Se adicionaron 100 μ l de perlas de vidrio lavadas en ácido de 400-600 μ m (Sigma cat. G8772-100G) y se homogenizaron durante 40 s a máxima velocidad en Fast Prep (Termo Savant Bio 101, FP 120). Inmediatamente se agregaron 300 μ l de Buffer de extracción CTAB 2X (2% (w/V) CTAB, 1.4M NaCl, 100mM Tris HCl pH 8.0, 20mM EDTA, ajustado a pH 8), se mezcló bien y se incubó a 65°C de 10 min a 30 min. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y se agregaron 300 μ l de cloroformo. Se mezcló por agitación en vortex y centrifugó por 5 min a 13000 rpm. Se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio y se adicionaron 300 μ l de isopropanol. Se dejó reposar por 15 min en hielo y se centrifugaron los tubos a 13000 rpm por 10 min. Se retiró el sobrenadante y se lavó la pastilla con 700 μ l de etanol al 70%. Los tubos se agitaron hasta despegar la pastilla del fondo del tubo, se centrifugaron a 13000 rpm por 5 min y por último se descartó el sobrenadante. El ADN se dejó secar para evaporar el etanol y se resuspendió la pastilla en 50 μ l de agua milli Q.

6.3.14 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para las PCRs de rutina, (para diagnóstico se utilizó) Taq. Polimerasa GoTaq® DNA polimerase (Promega No. M3005). Todos las PCRs se realizaron en mezclas de reacción de 25 μ l con los siguientes componentes:

2.5 μ l	Buffer 10X. (200 mM Tris-HCl(pH 8)/500 mM KCl)
0.5 μ l	Mezcla de dNTP (10 mM)
0.7 μ l	MgCl ₂ (50 mM)
0.5 μ l	Primer Forward (10 μ M)
0.5 μ l	Primer Reverse (10 μ M)
1.0 μ l	Templado
0.5 μ l	DNA polimerasa.

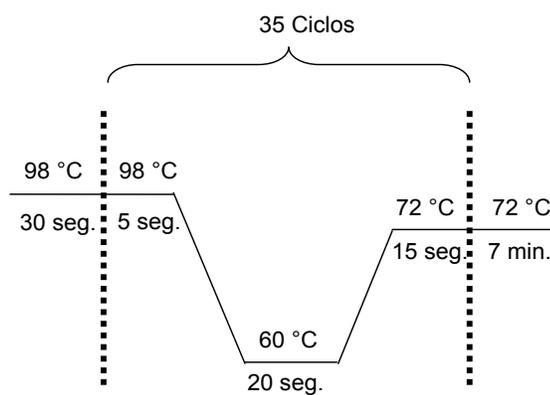
Y se utilizó el siguiente programa:



Para la amplificación de los productos para clonación se utilizó la enzima Phusion[®], High-Fidelity PCR Master Mix (Finnzymes No. F-530S) bajo las recomendaciones de la casa comercial. Con la siguiente mezcla de reacción de 25 μ l:

12.5 μ l	2X Phusion [®] Master Mix (0.04 U/ μ l Phusion ADN Polimerase/ 2X Phusion [®] HF buffer/ 400 μ M de mezcla . de dNTP's/ DMSO).
0.5 μ l	Primer Forward (10 μ M)
0.5 μ l	Primer Reverse (10 μ M)
X μ l	ADN templado (200 ng)
Volumen final de 25 μ l	Agua milli Q.

Y se utilizó el siguiente programa:



6.3.15 Electroforesis

Para la visualización de ácidos nucleicos (productos de PCR) se prepararon geles de agarosa al 1% en buffer TAE (40 mM Tris-Acetato/ 1mM EDTA). Los productos de PCR se corrieron en cámaras de electroforesis horizontales por 1 h a 70 volts. Los geles se tiñeron con Bromuro de etidio (0.5 µg/ml) (Sambrook y Russell, 2001) y se observó en un fotodocumentador (BioDoc.It™ Imaging System UVP).

6.3.16 Estrés salino en levaduras

Las levaduras transformadas pYES2.1-OpsLTP-W303 y pYES2.1-W303 fueron cultivadas a partir de una colonia aislada en medio SD-URA (medio YNB 0.67% + 2% de glucosa + 2% sacarosa + 0.01% Adenina, + 0.01% de Triptofano + 0.01% Leucina + 0.005% Histidina) a 30°C a 150 rpm. De este cultivo se cosecharon las células y se lavaron con agua desionizada para posteriormente resuspenderse en 40 ML de medio SD-URA de tal manera que se obtuviera una OD 600 nm de 0.5± 0.1 inicial. El cultivo se creció en matraces Erlenmeyer de 250 ml. Las condiciones del cultivo fueron a 30°C, 150 rpm y se realizaron muestreos cada 8 h por un lapso de 40 h. las mediciones se realizaron en un espectrofotometro Beckman DU 600. Se realizaron cultivos control donde el medio SD-URA y se le adicionó ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml. Los cultivos con tratamiento que contenían medio SD-URA suplementado con 1.5M de NaCl y 100 µg/ml de Ampicilina. En cada medio de cultivo se crecieron por separado cada una de las líneas de levaduras y se realizó por quintuplicado para su posterior análisis estadístico. Metodología basada y modificada de Yu *et al.* (2005).

6.3.17 Estrés térmico a -20°C en levaduras

Para la prueba de estrés por congelación en las líneas de *S. cerevisiae* W303-1A transformadas a las que se les denominó pYES2.1-OpsLTP-W303 y pYES2.1-W303, se crecieron colonias aisladas de cada línea en medio SD-URA (medio YNB 0.67% + 2% de glucosa + 2% sacarosa + 0.01% Adenina, + 0.01% de Triptofano + 0.01% Leucina + 0.005% Histidina). De este cultivo se cosecharon por centrifugación y se lavaron con agua desionizada. La aplicación del estrés se realizó de acuerdo a lo descrito por Yu *et al.* (2005) y a continuación se describe: en tubos Eppendorf 1.5 ml se colocaron 400 µl de células a una OD600 = 0.5 y fueron almacenadas en un recipiente con etanol a -20 °C por 48 h. Posteriormente las células se descongelaron, fueron inoculadas en 40 ml de medio SD-URA y se crecieron en matraces Erlenmeyer de 250 ml en condiciones normales, a 30°C, 150 rpm. Se realizaron muestreos cada 8 h por un lapso de 40 h. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU 600. Se realizaron cultivos control donde se inocularon cultivos los cuales no llevaron el tratamiento de congelamiento en medio SD-URA, adicionado Ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml y cultivos con tratamiento (-20°C) que contenían medio SD-URA suplementado 100 µg/ml de ampicilina, en cada medio de cultivo se crecieron por separado cada una de las líneas de levaduras y se realizó por quintuplicado para su posterior análisis estadístico.

6.3.18 Estrés alcalino en levaduras

Para los tratamientos de estrés alcalino en las líneas transformadas pYES2.1-OpsLTP-W303 y pYES2.1-W303, se crecieron colonias aisladas de cada línea en medio SD-URA (medio YNB 0.67% + 2% de glucosa + 2% sacarosa + 0.01% Adenina, + 0.01% de Triptofano + 0.01% Leucina + 0.005% Histidina) a 30°C a 150 rpm. De éste cultivo se cosecharon las células por centrifugación y se lavaron con agua desionizada para posteriormente resuspenderse en 40 ml de medio YPDGR (medio YP + 1.94% galactosa + 0.06% dextrosa y 1% de rafinosa) de tal

manera que se obtuviera una OD 600 nm de 0.3 ± 0.05 inicial. El cultivo fue crecido en matraces Erlenmeyer de 250 ml. Las condiciones del cultivo fueron a 30°C, 150 rpm y se realizaron muestreos cada 8 h por un lapso de 40 h. Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Beckman DU 600. Se utilizaron cultivos control donde al medio YPDGR se le adicionó Ampicilina a una concentración final de 100 ug/ml y cultivos con tratamiento que contenían medio YPDGR suplementado con 37 mM de Na₂CO₃ y 100 µg/ml de ampicilina (pH de 8.6). En cada medio de cultivo se crecieron por separado cada una de las líneas de levaduras y se realizó por quintuplicado para su posterior análisis estadístico (Liu *et al.* 2006).

6.3.19 Estrés salino y Osmótico en germinación de *A. thaliana*.

Con la finalidad de determinar si la mutante insercional SALK_095248 y la sobre-expresante *OpsLTP1* (que para fines prácticos en lo sucesivo se le llamará “Over-*OpsLTP1*”), estas líneas otorgan fenotipos de tolerancia durante el estrés durante el proceso de germinación en condiciones de estrés. Los experimentos se hicieron en medio MS solido con la adición de 75, 100, 150 y 200 mM de NaCl para los ensayos de estrés salino y por otra parte para los tratamientos de estrés osmótico se prepararon cajas Petri con medio MS y estabilizadas con Polietilen glicol (PEG) (peso molecular 8000 Marca SIGMA P5413) como lo describe Van Der Weele (2000), que a continuación se menciona:

A 10 ml de medio de cultivo preparado 24 h antes, se le agregó aproximadamente 10 ml de solución de PEG en la parte superior del medio. Después de 24 horas de estabilización se desechó la solución excedente de PEG. Durante el periodo de 24 h el PEG se difundió en medio con agar lo que disminuye su potencial hídrico ya que se utilizaron 3 concentraciones diferentes de PEG y se obtuvieron los siguientes potenciales osmóticos en el medio: -0.47, -0.57 y -1.06 MPa. Para los ensayos de las líneas mutantes y para los ensayos de líneas sobre-expresantes generaron -0.41, -0.83 y -1.15 MPa. A estos organismos se les estimó el

porcentaje de germinación por 8 días a partir de la primera semilla que mostró la emergencia de la radícula. Se midió la longitud de la raíz mediante análisis de imagen (Aplicación de Procesamiento de Imágenes para la medición de raíces de *Arabidopsis thaliana*) después de 15 días de comenzar la germinación. Se estimó el porcentaje de organismos con cotiledones verdes después de 15 días de comenzar la germinación.

6.3.20 Estrés salino y osmótico en plántulas de *A. thaliana*

Para la evaluación las de plantas de *A. thaliana* se realizó el protocolo descrito por Verslues *et al.* (2006) que a continuación se describe:

Las semillas de *A. thaliana* línea Col-0, SALK, Over *OpsLTP1* se desinfectaron y se estratificaron como se indica en el apartado de “cultivo in vitro de *A. thaliana*”. Posteriormente se sembraron y se dejaron crecer por 8 días con las cajas Petri en posición vertical. A continuación con la ayuda de pinzas de disección se transfirieron a cajas Petri que contenían Medio MS sólido suplementado con 100, 150 y 200 mM de NaCl. Después de diez días de crecimiento bajo condiciones de estrés, las plantas fueron transferidas a sustrato (Sun shine, vermiculita, perlita expandida 2:1:1) y crecidas en cámara bioclimática a 23-25 °C con 16/8 h luz/noche. Después de 8 días se examinaron para determinar el porcentaje de plantas recuperadas.

6.3.21 Estrés térmico a -20°C en plántulas de *A. thaliana*

Se desinfectaron semillas de *A. thaliana* línea Col-0, SALK, Over *OpsLTP1* y se sembraron en medio MS 50%. Una vez que presentaron sus primeras hojas cotiledonarias fueron transferidas a sustrato (Sun shine, vermiculita, perlita expandida 2:1:1) y crecidas en cámara bioclimática a 23-25 °C con 16/8 h luz/noche. Las plantas se regaron con agua adicionada con fertilizante (Peters 281 Plantula Iniciador) dos veces por semana, estas fueron crecidas hasta la edad de un mes. Posteriormente se realizó el ensayo de congelamiento el cual consiste en:

un proceso de aclimatación de 12 h a 4°C. Posteriormente se le dió el tratamiento de 2 h a -20 °C. A continuación se devolvieron a aclimatación por 12 h a 4°C para finalmente regresarlas a la cámara bioclimática a 23-25 °C con 16/8 h luz/noche. Para la evaluación de supervivencia se tomó como criterio el número de organismos que produjeron al menos una nueva hoja. Se les considero como sobrevivientes después de 15 días de recuperación (Reyes *et al.*, 2006).

6.3.22 Aplicación de Procesamiento de Imágenes para la medición de raíces de *Arabidopsis thaliana*

La medición de la longitud de raíz en las muestras de *Arabidopsis thaliana* se realiza comúnmente mediante el uso de un vernier, sin embargo, dicho método presenta ciertos inconvenientes como lo es la manipulación mecánica de la raíz y el error que se introduce al intentar concatenar la medición de segmentos subsecuentes para secciones no lineales. El uso de técnicas de procesamiento de imágenes permite realizar dichas mediciones evitando los anteriores inconvenientes. En la siguiente sección se describe la metodología empleada.

6.3.22.1 Adquisición de la Imagen

Para obtener la imagen digital de las raíces se empleo un escanner de hoja completa marca (HP Scanjet G3110) con resolución de 1200 dpi. Obteniendo imágenes de 1447 x 1993 pixeles, con una resolución de 300 x 300 ppp, en un espacio de color sRGB con una resolución en color de 24 Bits. El uso de un escanner de hoja completa, a diferencia de una toma fotográfica, proporciona una iluminación homogénea, constante, y evita la distorsión geométrica generada por la lente objetivo de la cámara, la cual se incrementa en proporción directa a la distancia radial del centro de la imagen Como fondo de imagen se utilizó una tarjeta gris neutro para calibración de balance de blancos y reflectancia Edmund Scientific H58-609, lo que permite normalizar colores ante diversas condiciones de

iluminación. Con la finalidad de calibrar las mediciones se digitalizó con cada imagen una regla graduada en centímetros. La Figura 6; muestra una imagen típica con esta configuración.



Figura 6. Imágen de raíces obtenida mediante un escaner de hoja completa. Nótese la tarjeta de calibración, la iluminación homogénea, y que la regla no presenta distorsión.

6.3.22.2 Análisis de imagen

Se programó una aplicación autoejecutable con una interface gráfica de usuario (GUI) para realizar las mediciones a partir de algoritmos implementados en Matlab 7.11.584 (R2010b). La interface gráfica se muestra en la figura 7. Una vez cargada una imagen, el programa permite efectuar una calibración, para lo cual se selecciona con el cursor dos puntos que representen una distancia lineal de un centímetro auxiliados por la regla graduada. Las coordenadas de ambos puntos permiten determinar la distancia entre ellos en pixeles determinada por la siguiente fórmula:

$$d(a)=\text{sqrt}((x((a+1))-x(a))^2+(y((a+1))-y(a))^2);$$

donde “a” constituye el índice para el vector de coordenadas de los puntos seleccionados, en este caso 2, y “d” la distancia euclidiana entre puntos.

Una vez determinada la equivalencia en pixeles para una distancia de un centímetro, se procede a medir la longitud de la raíz en cuestión, mediante la selección de puntos sucesivos sobre su imagen. Esta técnica permite calcular cualquier segmento curvo como una aproximación lineal, que será más precisa cuanto mayor sea el número de puntos seleccionados. Las coordenadas de los puntos seleccionados se almacenan vectorialmente y la longitud total de la raíz se calcula como la suma de los segmentos que la componen.



Figura 7. Interface gráfica de usuario para medir la longitud de la raíz. En rojo la recta de calibración, en azul los segmentos de recta que permiten obtener la longitud de la raíz, en este caso 8.07 cm.

6.3.23 Análisis estadístico

Todos los datos son presentados como medias \pm error estándar. Previo a los análisis estadísticos, los datos fueron sometidos a pruebas de bondad de ajuste, incluyendo la prueba de normalidad, y el análisis de homogeneidad de varianzas de Barlett (Zar, 1999). Todos los datos que se expresan en porcentajes, al no cumplir con los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se procedió a realizar transformación arcoseno, \ln (Zar, 1999). Para detectar diferencias significativas entre los tratamientos se aplicaron pruebas paramétricas de varianza de una vía (ANOVA) o t-Student, (Zar, 1999).

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización bioinformática de LTP

Mediante el análisis de alineamiento múltiple de secuencias de proteínas de LTPs de diferentes especies de plantas, incluyendo la *OpsLTP1*, se logró identificar el motivo estructural conservado: 2/3-C-8-C-12/15-CC-19-C-1-C-21/23-C-13-C4/8 (Figura 8), la presencia de un péptido señal de 26 aminoácidos, que se direcciona a la región extracelular (Figura 9). El filograma (Figura 10) muestra que la LTP de *Opuntia* se agrupa con las secuencias de *Nicotiana tabacum*, *Solanum chacoense* y *Lycopersicon esculentum*.

```

Sorghum      --MAR---LAVAIAVVAAVVVVLAATTSEAAISCCQVSSAIAIACLSYARGQ-GFAPSAGC 54
Zea          --MARTQ-QLAVVATAVVALVLLAAATSEAAISCCQVSAIAIACLSYARGQ-GSGPSAGC 56
Oryza        --MAR---AQLVLVALVAALLLAA-PHAAVAITCCQVNSAVGFCLSYARG--GAGPSAAC 52
Triticum     --MAR---AQVMLMAVALVLMMLAAVPRAVAIDCCQVDSLVRFCLSYVQG--GPGPSGQC 53
Hordeum      --MARAATQVLVAVMAAMLLVA---TDAAISCCQVSSALSFCLSYARGN-GAKPPVAC 54
Nicotiana    ---MEIAGKIACFVVL--CMVVAAPC-AEA-ITCCQVTSNLAFCLAYLRN--TG-PLGRC 50
Solanum      ---MEIVSKIACFVVL--CMVVVAPH-AEAALITCCQVTSLSLFCCLPYLRN--TG-PLGDC 51
Lycopersicon ---MEMFGKIACFVVF--CMVVVAPH-AES-LSCCQVTSGLAFCLPYLEG--RG-PLGGC 50
Opuntia      -MASSAVVKLACAVFL--CMVVAAPY-AEAAITCCQVAVQNLAFCITFLKA--GGAPSAAC 54
Gerbera      --MASVMNVLCVAVA--CMVFSASY-ADA-ISCCQVTSGLVFCNGYLA--GGPVPPAC 52
Helianthus   --MAKMMVMVLCAGVT--CMVVGAPY-TEA-LSCCQVSSSLAFCLSYLTK--GGAVPPAC 52
Prunuspersica MASSGQLLKLVLVAVMCCMAVGGPK-AMAAVSCQVNNLTCCLNYVAN--GGALNPS 57
Gossypium    ---MAGLVKLSCLVLA--CMIVAGPIATNAALSCTVSGNLAFCLGYLTQ-NGP-LPRGC 53
Brassicinapus ---MAGLMKLAFLIFA--CMIVAGPITSNAALSCTVSGYVAFCLGYLAQ-NAPAVPTAC 54
Brassicaoleracia ---MAGVMKLAFLLLA--CMIVAGPITSNAALSCTSVNSNLAFCLGYVLQ-GGV-IPPAC 53
Arabidopsis  ---MAGVMKLAFLLLA--CMIVAGPITSNAALSCTSVNSNLAFCLGYVLQ-GGV-IPPAC 53
Cicer        ----MASMKVVCVALIM-CIVI--APMAESAITCQRVDTALAFCLGYLQ--GPGPSAQC 51
Phaseolus    ----MATLNSACVVAVL-CLVLTAPTAAHAAISCCQVTSNLAFCLPYVVRG--GGAVPPAC 53
Prunusdulcis ----MAYSAMTKLALVV-ALCMVVSVP IAQAITCCQVSSNLAFCLPYVVRG--GGAVPPAC 53
Prunusavium  ----MAYSAMTKLALVV-ALCMVVSVP IAQAITCCQVSSNLAFCLPYVVRG--GGAVPPAC 53
Prunusdomestica -----ITCCQVSSNLAFCLNYVKG--GGAVPPAC 27
Prunusarmeniaca -----ITCCQVSSNLAFCLGYVRG--GGAVPPAC 27
Malus        ----MASSAVTKLALVV-ALCMAVS--VAHAITCCQVTSNLAFCLGYVRS--GGAVPPAC 51
Daucus       ----MGVLRSSFVAMVMYMLATTPNAEAVLTCQVTSNLAFCLGYLRSQVNVVPLTC 56
Pinus        MAVKKMVEAVFVVGVLVVTMMNVGWAVPVEGAISCCQVSSAMTFCATYLIG-NAATPAATC 59
Ricinus      -----MKNIFFSVFFLLSFLCLANVSEAAVPCSTVDMKAAACVGFATG-KDSKPSSAC 53
Allium       ---MVRVVSLLAASTFILLIMI I SSPYANSQNTCQRVNRIVTFCVAYGLG---RAPIAFC 54

```

Sorghum	CGVRSLSNAARTTADRRAAC	CKNAARGIS---GLNAGN-AASIPSKCCVS--VPYTI	108
Zea	CGVRSLSNNAARTTADRRAAC	CKNAAGVS---GLNAGN-AASIPSKCCVS--IPYTI	110
Oryza	CGVRSLKAAASTTADRRTAC	CKNAARGIK---GLNAGN-AASIPSKCCVS--VPYTI	106
Triticum	CGVKNLHNQARSQSDRQSA	CKGIARGIH---NLNEDN-ARSIPPKCCVN--LPYTI	107
Hordeum	CGGVKRLAGAAQSTADKQA	CKSLATSIK---GINMGK-VSGVPGKCCVS--VPFPI	108
Nicotiana	CGGVKALVNSARTTADRQIA	CKSAAGAIS---GINLGK-AAGLPSTCCVN--IPYKI	104
Solanum	CGGVKKLKGQAQTADRQTA	CKSTAGSIK---GLNFGK-AASLPSTCCVN--IPYEI	105
Lycopersicon	CGGVKGLLGAAKTPEDRKT	CKSAANSIK---GIDT GK-AAGLPVCCVN--IPYKI	104
Opuntia	CGGVKKLVSMATTADRKTA	CKKQTAGTIP---GLNYGN-AAALPGKCCVS--VPYPI	108
Gerbera	CGVGRGLNNAAKTTPDRQTA	CKGILAANT---RINLNN-ANSLPGKCCIS--IGYKI	106
Helianthus	CGGVKSLNSAAKTPDRQA	CKKSAYNSIS---GVNAGN-AASFPKCCVS--IPYKI	106
Prunuspersica	CGVRSLSYSLAQTADRQSI	CKQAVNGIPY-PNANAGL-AAGLPKCCVN--IPYKI	113
Gossypium	CGGIKSLNSAAQTTPDRQA	CKSAAGIT---GINFGL-ASGLPGKCCVN--IPYKI	110
Brassiccanapus	CGVNTLNLMARTTTPDRQA	CKVGAANAFPT---LNAAAR-AAGLPKCCVN--IPYKI	107
Brassicaoleracia	CGVNTSLNLMARTTTPDRQA	CKVGAANALPT---INVAR-AAGLPKCCVN--IPYKI	108
Arabidopsis	CGGVKNLNSIAKTPDRQA	CKQGAARALGSG--LNAGR-AAGIPKCCVN--IPYKI	108
Cicer	CGGVRNLNSAAVTTPDRQA	CKKSAAGSIS---RLNANN-AAALPGKCCVN--IPYKI	105
Phaseolus	CGVRSLSNAAAKTTPDRQ	CKKSAAGAIP---GFNANN-AGILPGKCCVS--IHYNI	106
Prunusdulcis	CGGIRNVNNLARTTTPDRQA	CKKQLSASVP---GVNPNN-AAALPGKCCVN--IPYQI	107
Prunusavium	CGGIRNVNNLARTTTPDRQA	CKKQLSASVP---GVNPNN-AAALPGKCCVN--IPYQI	107
Prunusdomestica	CGGIRNVNNLARTTADRRA	CKKQLSGSIP---GVNPNN-AAALPGKCCVN--VPYKI	81
Prunusarmeniaca	CGGIRNVNNLARTTTPDR	CKKQLSGSIS---GVNPNN-AAALPGKCCVN--IPYKI	81
Malus	CGGIRTINGLARTTADRQ	CKKNLAGSIS---GVNPNN-AAGLPKCCVN--VPYKI	105
Daucus	CGVVRGLNNAARTTLDKRT	CKKQATANAVT---GLNLNA-AAGLPKCCVN--IPYKI	110
Pinus	CGSIRGLDSQVKATPDRQ	CKKTKQAKSYG---VKLGK-AANLPLGCFVTD-LNVPI	113
Ricinus	CGGLQQLAQTVKSVDDKKA	CKKASSKSLG---IKDQF-LSKIPACNLIK--VGFPV	106
Allium	CGALNDLR-FVNTRNLRR	ACKVGVVNRNP---GLRRNPRFQNI PRDCNFTFVRPFVW	110
	* : : . : : :	* * . * .	
Sorghum	STSTDCSRVS-----	118	
Zea	STSTDCSRVN-----	120	
Oryza	SASIDCSRVS-----	116	
Triticum	SLNIDCSRVS-----	116	
Hordeum	SMSTDCSRVH-----	118	
Nicotiana	SPSTDCSRVQ-----	114	
Solanum	SPSTDCSRVQ-----	115	
Lycopersicon	SPSTDCSRVQ-----	114	
Opuntia	SPNTDCSRVN-----	118	
Gerbera	TPNIDCSRIH-----	116	
Helianthus	SPSTDCSRVQ-----	116	
Prunuspersica	SPSTDCSRVQ-----	123	
Gossypium	SPSTDCSRVQ-----	120	
Brassiccanapus	SKSTNCSVR-----	117	
Brassicaoleracia	SKSTNCSVR-----	118	
Arabidopsis	STSTNCSVR-----	118	
Cicer	STSTNCSVR-----	116	
Phaseolus	STSTNCSVR-----	117	
Prunusdulcis	SPSTNCSVR-----	117	
Prunusavium	SPSTNCSVR-----	117	
Prunusdomestica	SASTNCSVR-----	91	
Prunusarmeniaca	SASTNCSVR-----	91	
Malus	STSTNCSVR-----	115	
Daucus	SPTDCSRVV-----	120	
Pinus	SPNVDCSRVH-----	123	
Ricinus	STATNCSVR-----	116	
Allium	RPRIQCCORINLTDKLIY	132	
	: * :		

Figura 8. Alineamiento múltiple de secuencias de LTPs reportadas por Carvalho y Gómez, 2007. En rectángulos rojos se muestran las cisteínas involucradas en la formación de puentes disulfuro. los asteriscos (*) representan aminoácidos conservados y los dos puntos (:) aminoácidos del mismo grupo.

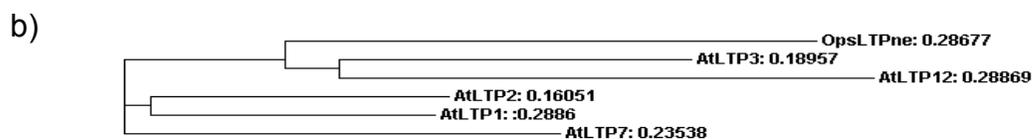


Figura 11. Alineamiento múltiple de 5 de LTPs de *A. thaliana* y *O. streptachanta*. a) Alineamiento múltiple de secuencias de 5 LTPs de *A. thaliana*. En rectángulos rojos se muestran las cisteínas involucradas en la formación de puentes disulfuro los asteriscos (*) representan aminoácidos conservados y los dos puntos (:) aminoácidos del mismo grupo. b) Filograma del alineamiento de secuencias de 5 LTPs de *A. thaliana*. Del lado derecho de cada nombre se encuentra la distancia relativa entre las ramas.

Al realizar la búsqueda de los niveles de expresión de *AtLTP3* en la base de datos de micro-arreglos en la página de AtGenExpress Visualization Tool (AVT) se logró observar que los patrones de expresión de *AtLTP3* presentan un comportamiento diferencial entre la parte aérea y la parte radicular ante diferentes tipos de estrés (Figura 12). Bajo estrés por frío, osmótico, salinidad y sequía se observa una mayor expresión en raíz y una menor expresión en parte la aérea.

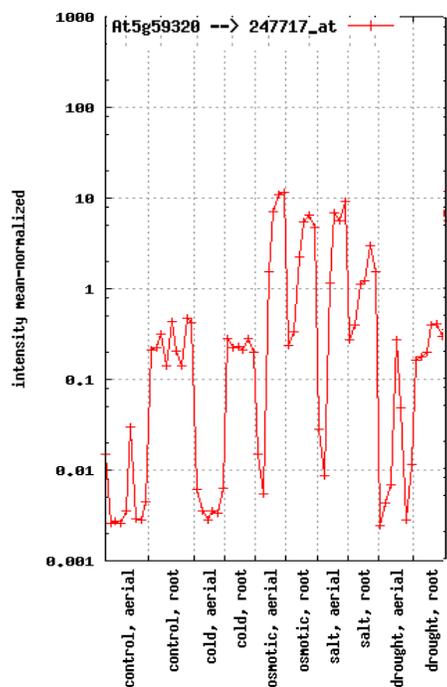


Figura 12. Diagrama donde se representa los niveles de expresión del gen *AtLTP3* bajo cuatro diferentes tratamientos: 4°C, 300 mM Manitol, 150 mM NaCl y Aire seco. Los tiempos de exposición al estrés fueron de 30 min, 1, 3, 6, 12 y 24 h. para los tres primeros tipos estrés, y 15 min para el último.

La base de datos de micro-arreglos de la Universidad de Toronto mostró que el gen *AtLTP3* se expresa mayoritariamente en estadios tempranos de desarrollo de las silicuas, primeros estadios de la germinación, en sépalos, pétalos, carpelos y pedicelo (Figura 13).

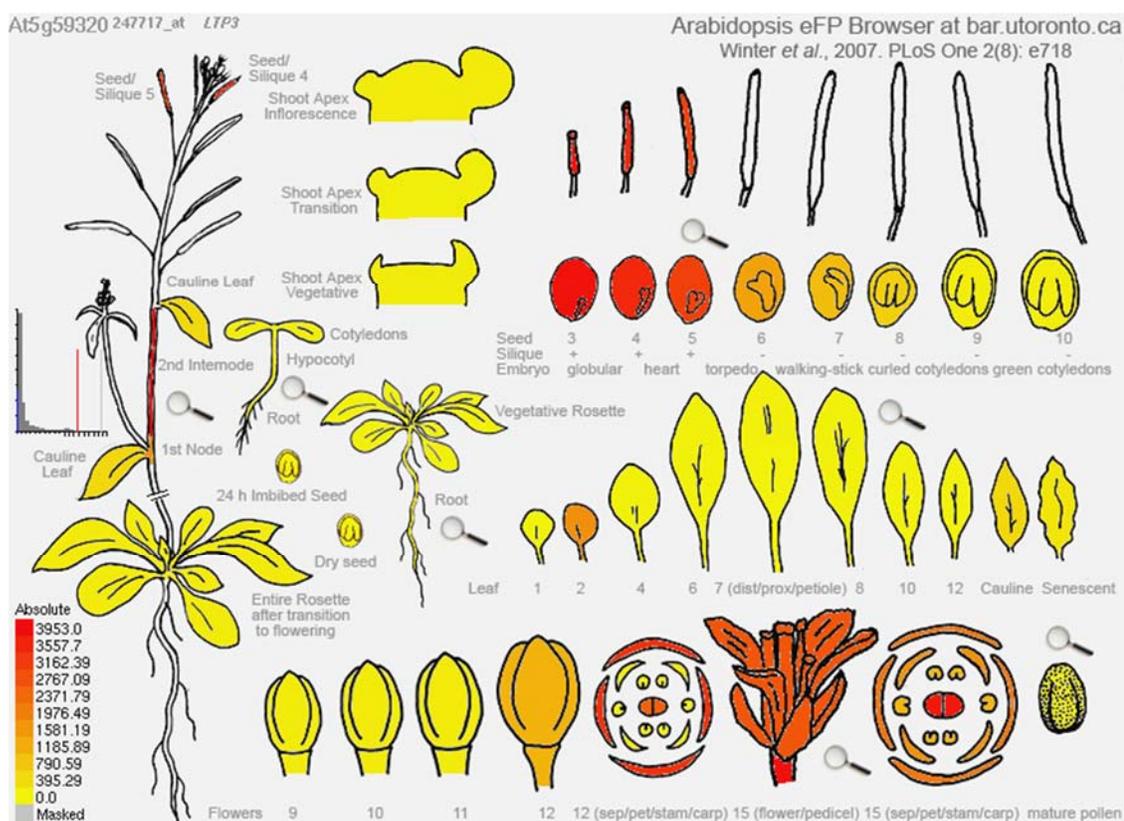


Figura 13. Expresión de *AtLTP3* por tejido. En rojo los mayores niveles de expresión, en amarillo los niveles más bajos, tomado de Winter *et al.* (2007).

Se obtuvo la secuencia de 2000 pares de bases río arriba (Anexo A.1.), del gen de *AtLTP3*, a partir de la cual se obtuvieron los siguientes elementos regulatorios mediante un análisis *in silico* (Tabla III).

Tabla III. Elementos de respuesta dentro de 2000 pares de bases río arriba del gen *AtLTP3*.

No. De secuencias	Características del elemento
1	(ARE) Elemento <i>Cis-actina</i> regulado por la inducción por anaerobiosis.
45	(CAAT-Box) Elemento <i>Cis-actina</i> común de regiones promotoras y potenciador.
1	(ERE) Elemento de respuesta a Etileno.
3	(SKN-1 motif) Elemento que regula la expresión en el endospermo.
1	(ABRE) Elemento <i>Cis-actina</i> involucrado en la respuesta a Acido Abscísico.
1	(CGTCA Motif) Elemento <i>Cis-actina</i> involucrado en la respuesta a Metil Jasmonato.
3	(HSE) Elemento <i>Cis-actina</i> involucrado en respuesta a estrés por choque térmico.
3	(MBS) Sitio de unión MYB envuelto en la inducción por sequia.
1	(TC-rich repeats) Elemento <i>Cis-actina</i> envuelto en defensa y respuesta a estrés.
1	(TCA-element) Elemento <i>Cis-actina</i> envuelto en respuesta a Acido salicílico.
1	(TGACG-Motif) Elemento <i>Cis-actina</i> envuelto en respuesta a Metil Jasmonato

Además se lograron identificar 24 elementos involucrados en respuesta a la luz y 4 elementos involucrados con el reloj circadiano.

7.2 Evaluación de levaduras W303-1A transformadas con la construcción pYES2.1::OpsLTP1 en estrés salino y estrés alcalino.

Se obtuvieron dos clonas de levaduras que contienen la construcción pYES2.1::OpsLTP1. La construcción fue proporcionada por el Laboratorio de Biología Molecular de Plantas y Hongos del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica. Se comprobó la dirección correcta del inserto en el vector mediante PCR utilizando los oligonucleótidos, Gal1 forward (AAT ATA CCT CTA TAC TTT AAC GTC) y OpsLTP1 reverse (TCC CTT GTC ATA TAG TCA TCC GAT C) amplificando un fragmento de 472pb (Figura 14 a), y posteriormente se transformaron células de *Saccharomyces cerevisiae* W303 (Figura 14 b).

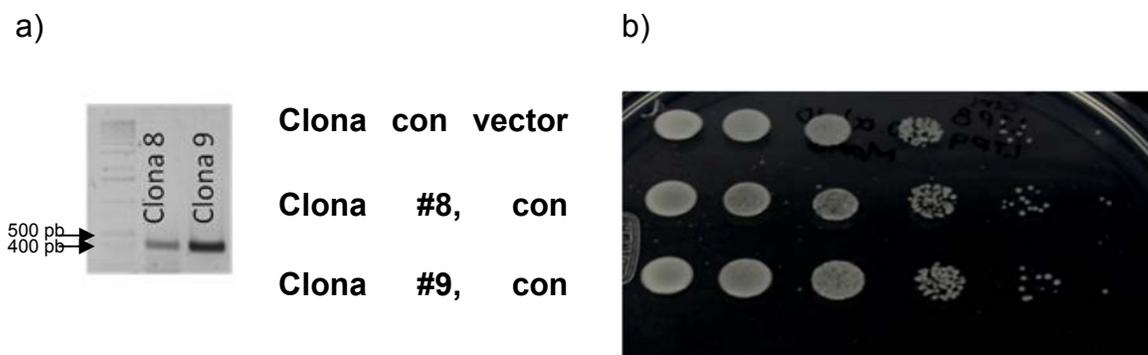


Figura 14. Identificación de levaduras con la construcción pYES2.1::OpsLTP1 . a) Amplificación por PCR para las clonas 8 y 9 con el Gen OpsLTP1. b) Colonias de *S. cerevisiae* transformadas; en diluciones de izquierda a derecha, iniciando con OD 600 igual a 0.5 y posteriores diluciones 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 y 1:100000 en medio SD-URA.

Los resultados obtenidos a partir de la curva de crecimiento de levaduras transformadas con la construcción pYES2.1::OpsLTP1 bajo estrés salino muestran

un evidente efecto por NaCl. Los cultivos sin tratamiento de NaCl, presentaron crecimiento de una OD₆₀₀ equivalente a 7.0144 y 6.8718 al término de 40 h tanto para la línea con vector vacío y la línea con la construcción pYES2.1::*OpsLTP1*, respectivamente. Las levaduras que crecieron bajo el efecto del estrés por NaCl, alcanzaron una OD₆₀₀ equivalente a 3.4202 y 3.4462 (vector vacío y construcción pYES2.1::*OpsLTP1* respectivamente). No se observaron diferencias significativas en el crecimiento bajo estrés por NaCl de levaduras con el vector y levaduras con la construcción pYES2.1::*OpsLTP1*, excepto a las 16 h donde las levaduras con la construcción pYES2.1::*OpsLTP1* presentaron una media de 1.10116 a una OD₆₀₀, mientras que las levaduras con el vector vacío presentaron una media de 0.8288 a una OD₆₀₀ (Figura 15). Con respecto a la curva crecimiento de levaduras bajo estrés iónico con Na₂CO₃, se encontraron diferencias significativas a las 8 y 16 h entre la línea que contenía el vector vacío y la línea con la construcción pYES2.1::*OpsLTP1* (Figura 16). También se observó un efecto a las 8, 16 y 40h en los cultivos con tratamiento de Na₂CO₃ y los cultivos control. El estrés por congelamiento no mostró diferencias significativas entre los cultivos que contienen el vector vacío y los que contienen la construcción pYES2.1::*OpsLTP1*, sin embargo, sí se observó una disminución en el crecimiento de las levaduras control y las del tratamiento (Figura 17).

Estrés Salino 1.5 M NaCl

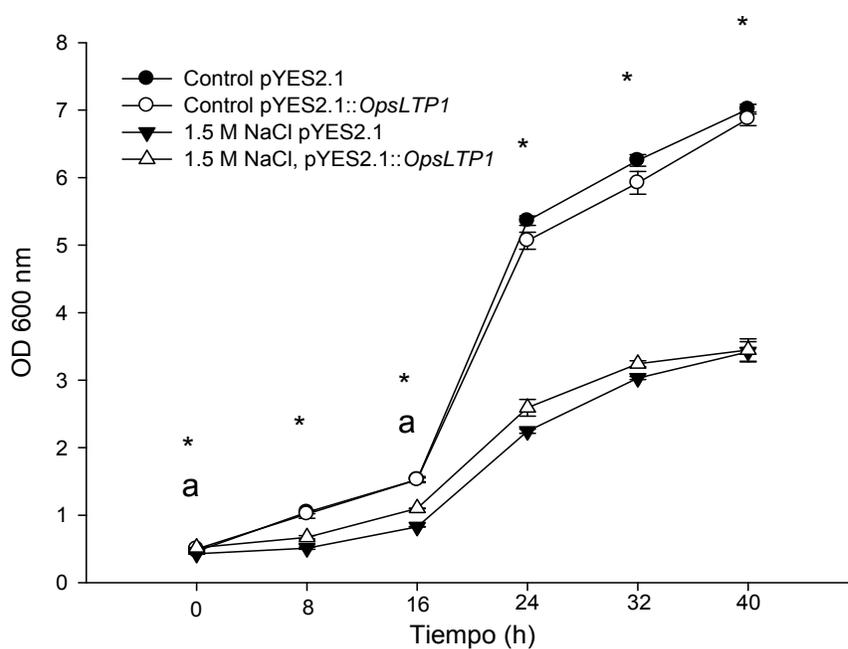


Figura 15. Curva de crecimiento de levaduras bajo estrés salino (1.5 M NaCl). Las figuras negras corresponden a controles, solo vector (pYES2.1) y figuras blancas el vector pYES2.1::*OpsLTP1*. Los triángulos corresponden al tratamiento 1.5 M de NaCl y los círculos a controles no estresados. $P < 0.05$ * =Diferencia significativa entre tratamientos y a=Diferencia significativa entre levaduras con vector vacío y levaduras con la construcción pYES2.1::*OpsLTP1*.

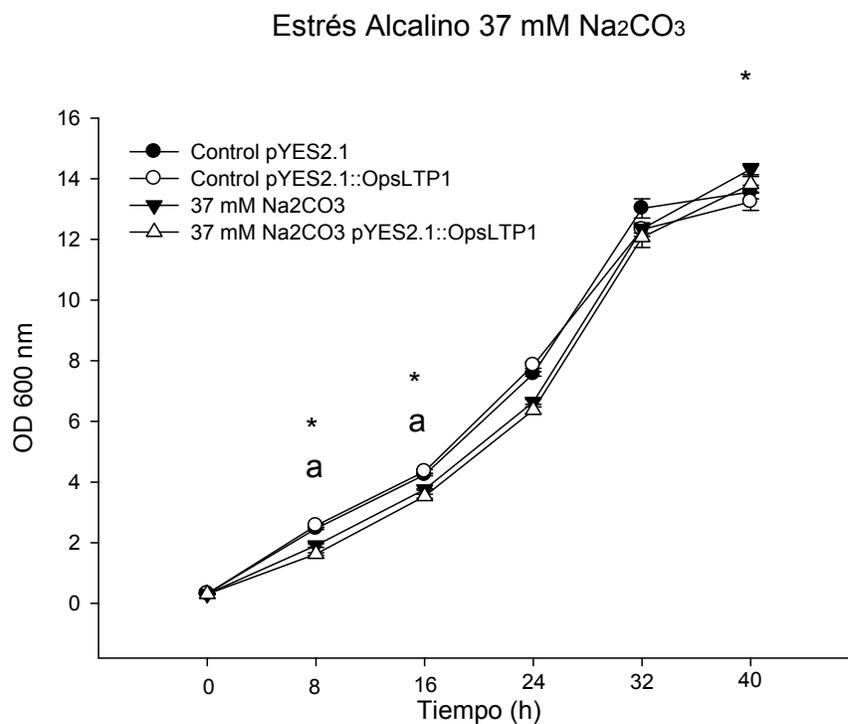


Figura 16. Curva de crecimiento de levaduras bajo estrés alcalino (Na₂CO₃ 37 mM). Las figuras negras corresponden a controles, solo vector (pYES2.1) y figuras blancas el vector pYES2.1::*OpsLTP1*. Los triángulos corresponden al tratamiento 37 mM de Na₂CO₃ y los círculos a controles no estresados. P < 0.05 * =Diferencia significativa entre tratamientos y a=Diferencia significativa entre levaduras con vector vacío y levaduras con la construcción pYES2.1::*OpsLTP1*.

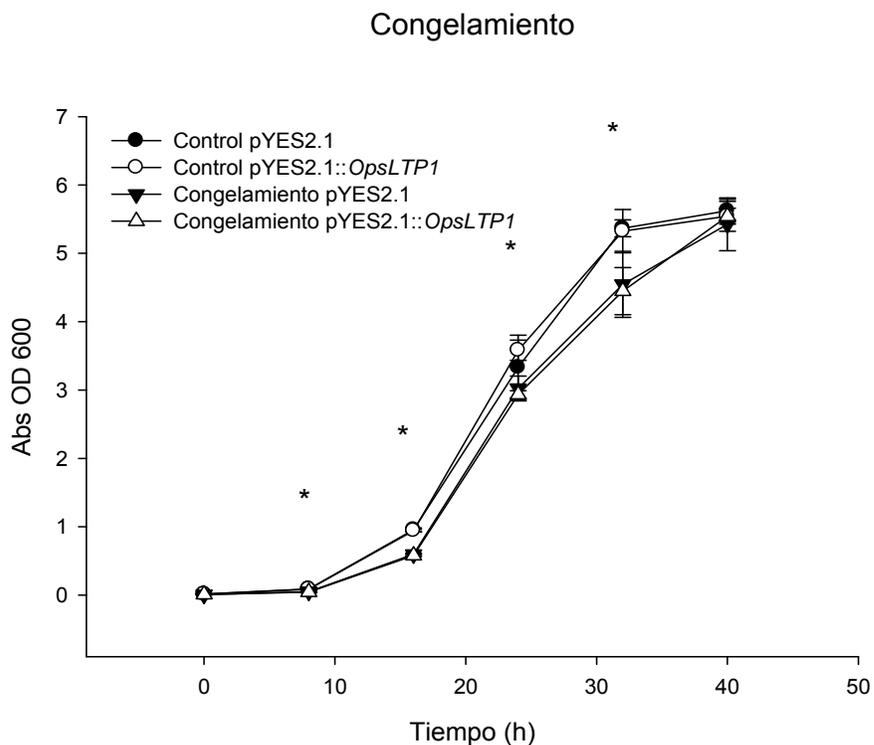


Figura 17. Curva de crecimiento de levaduras bajo estrés por congelamiento (-20°C , 48 h). Las figuras negras corresponden a controles, solo vector (pYES2.1) y figuras blancas el vector pYES2.1::*OpsLTP1*. Los triángulos corresponden al tratamiento de congelamiento (-20°C) y los círculos a controles no estresados. $P < 0.05$ * =Diferencia significativa entre tratamientos y a=Diferencia significativa entre levaduras con vector vacío y levaduras con la construcción pYES2.1::*OpsLTP1*.

7.3 Selección y evaluación de mutantes homocigotas con pérdida de función para el gen *AtLTP3* de *A. thaliana* bajo estrés salino y osmótico

A partir de 20 plantas mutantes SALK_095248 (Figura 18 a y b), se extrajo ADN genómico para identificar por PCR las mutantes homocigotas para *AtLTP3*. Se utilizaron los cebadores SALK_095248LTP forward (Figura 18 b-1), y SALK_095248 Reverse (Figura 18 b-2), que flanquean la inserción. La presencia de un amplicón de 1025 se tomaría como indicador de plantas no mutantes (Figura 19, C). Con la finalidad de confirmar la presencia del ADN-T se utilizaron los primers SALK_095248 forward (Figura 18 b-1), y LB1 (Figura 18 b-3), que amplifican un producto de 500 pb (Figura 19 D); 18 plantas analizadas resultaron positivas y se seleccionaron como mutantes homocigotas.

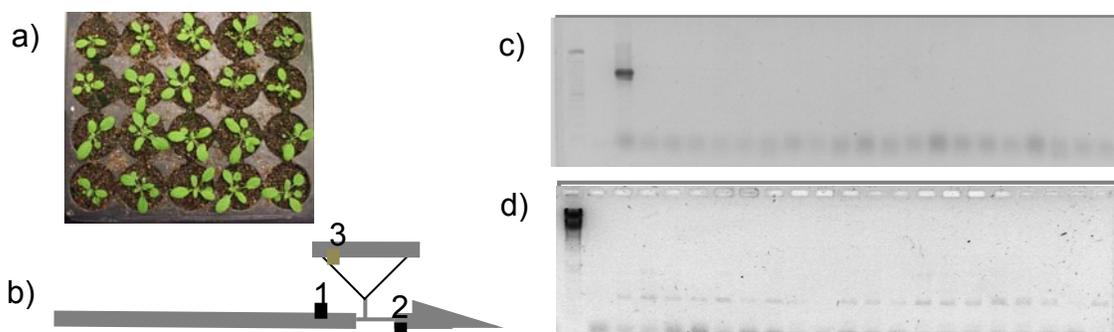
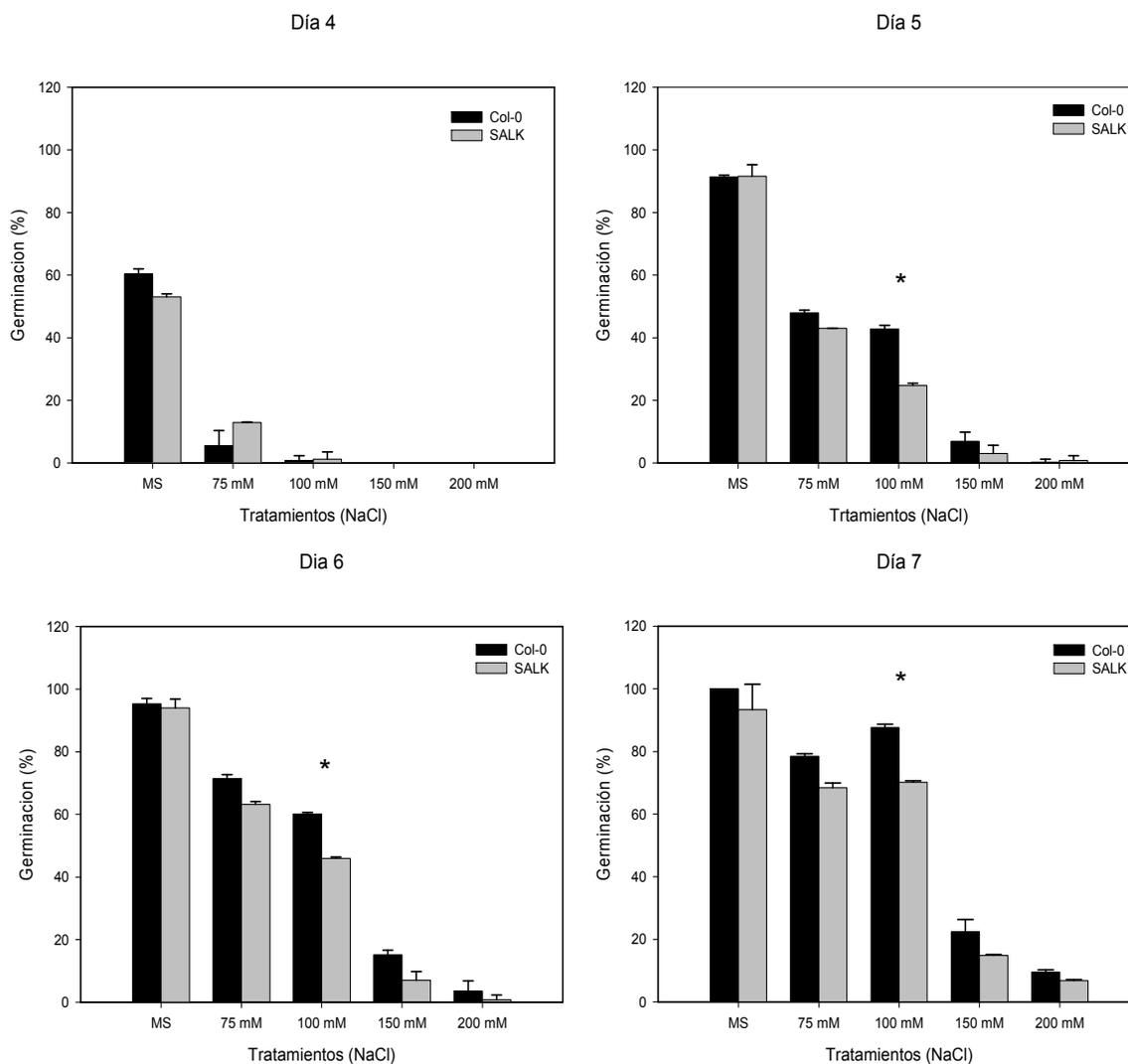


Figura 18. Selección de mutantes homocigotas de *A. thaliana*. a) Plántulas de *A. thaliana* mutantes homocigotas b) Esquema de la inserción en el gen *AtLTP3*. La barra negra (1) representa el sitio de unión del cebador SALK_095248 forward, la barra negra (2) indica el sitio de unión del primer SALK_095248 reverse y la barra café el sitio de unión del primer LB1 (3); c) Gel de agarosa al 1.2% con productos de PCR utilizando los oligonucleótidos SALK_095248LTP reverse y SALK_095248 forward; primer carril MPM, segundo CTL negativo, tercero Templado de Col-0, de la posición 4-23 templado de las diferentes plantas mutantes. d) Gel de agarosa al 1.2% con productos de PCR utilizando los oligonucleótidos SALK_095248 forward y LB1; primera posición MPM; segunda posición CTL negativo, 3-22 templado de las diferentes plantas mutantes.

Para la evaluación funcional de las plantas SALK_095248 de *A. thaliana*, se realizaron ensayos de germinación con líneas mutantes SALK_095248 contrastadas con plantas silvestres (Col-0) bajo estrés salino. Durante todo el ensayo se observó una tendencia en la disminución del porcentaje de germinación por parte de la línea mutante (de aquí en adelante denominada SALK) con respecto a la línea silvestre (Figura 19). Los primeros germinados se obtuvieron a partir del día 4, del día 5 al día 7 las mutantes homocigotas mostraron un retraso significativo en la germinación en el tratamiento de 100 mM de NaCl. Posteriormente al día 9 se encontraron diferencias significativas para el tratamiento de 75 y 100 mM de NaCl.



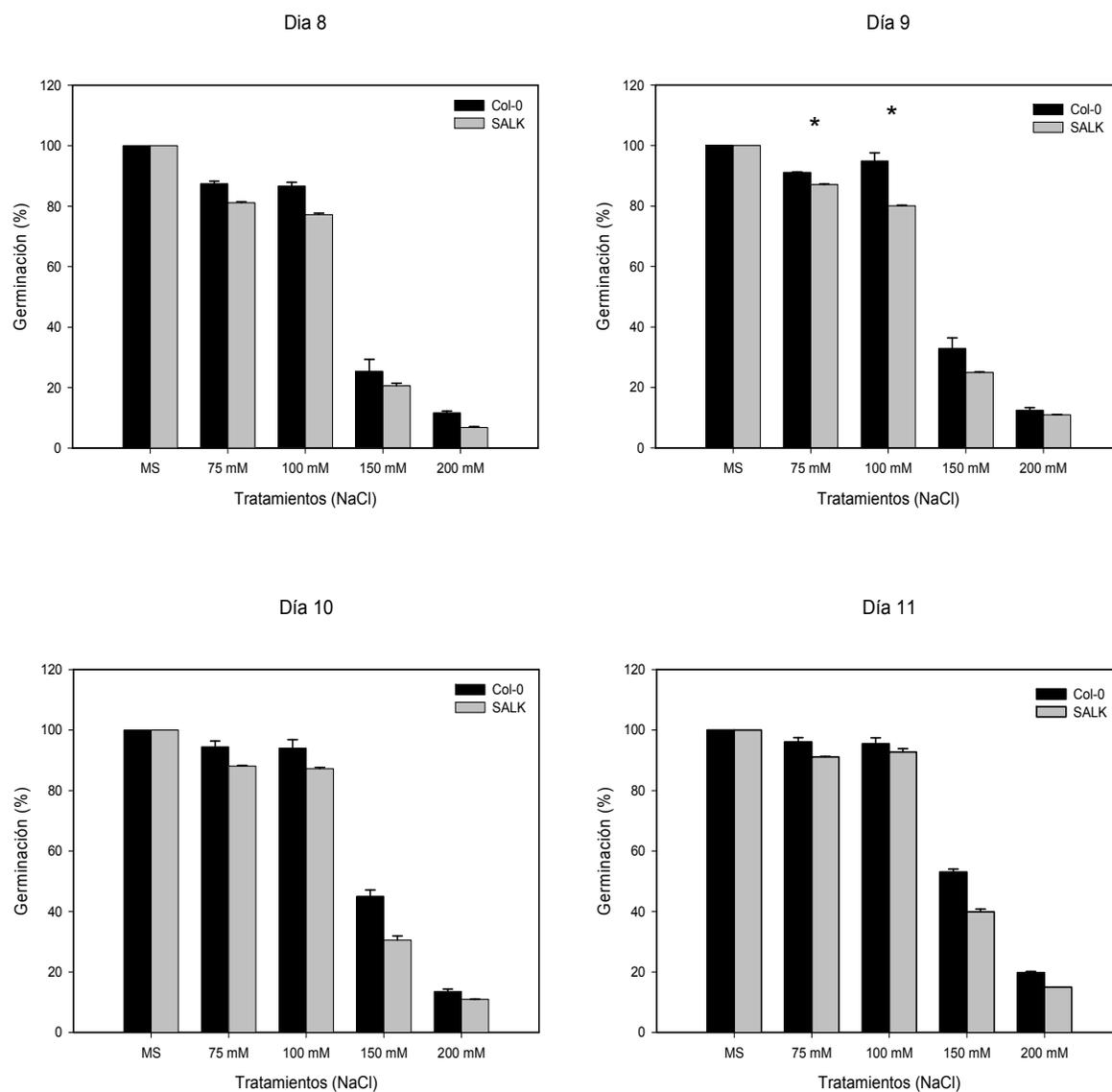


Figura 19. Porcentaje de germinación de *A. thaliana*, Col-0 y SALK durante 11 días de muestreo. (Medio MS al 50% bajo diferentes concentraciones de NaCl (75, 100, 150 y 200 mM). $P < 0.05$ * =Diferencia significativa entre las dos líneas de cada tratamiento).

Las plántulas se dejaron crecer hasta la edad de 15 días post-germinación en sus respectivos tratamientos y se observó que la talla de la raíz en la línea mutante es de menor longitud ya que presentó una media 17.96 ± 6.93 y 10.412 ± 1.63 y la línea silvestre 25.95 ± 5.86 y 12.97 ± 1.003 en los tratamientos de 75 y 100 mM de NaCl respectivamente (Figura 20 y 21). No se midieron las raíces de los tratamientos de 150 y 200 mM debido al reducido tamaño de estas. En cuanto al número de cotiledones verdes se encontraron diferencias significativas, ya que se observó un promedio de $84.19\% \pm 0.34$ en plantas Col-0 y un promedio de $60.10\% \pm 0.65$ en plantas de la línea mutante a 75 mM de NaCl. Bajo el tratamiento de 100 mM de NaCl la línea mutante presentó un promedio de $11.24\% \pm 1.19$ mientras que en la línea silvestre mostró un promedio de $26.67\% \pm 0.65$ después de 15 días de estrés. En cuanto al ensayo de recuperación se logró identificar diferencias significativas ya que se observó un promedio de $76.16\% \pm 0.403$ en la línea silvestre y la línea mutante 52.01 ± 2.30 en las plantas que fueron expuestas a estrés salino en la concentración de 150 mM de NaCl (Figura 21 y 22).

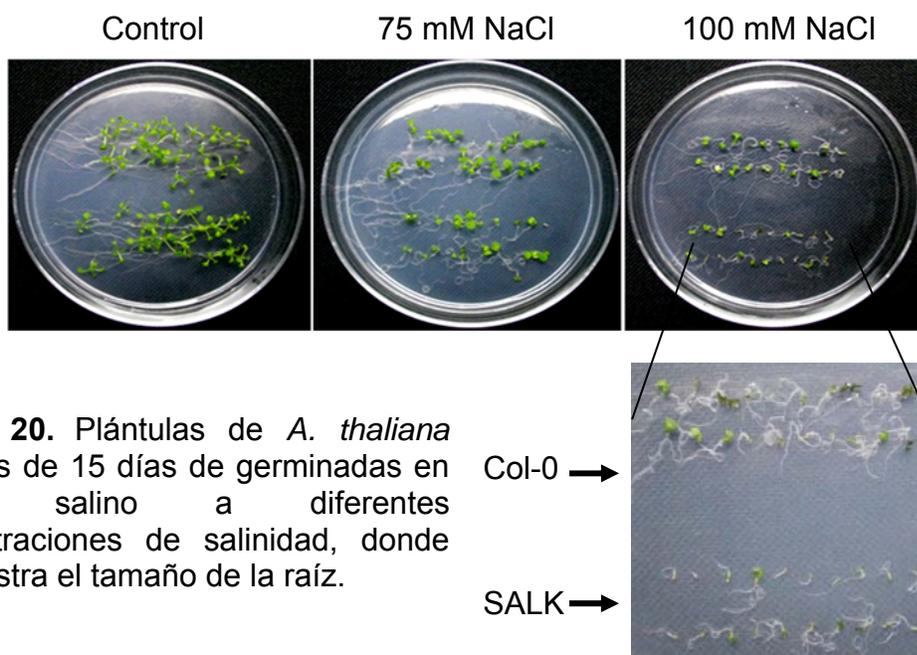


Figura 20. Plántulas de *A. thaliana* después de 15 días de germinadas en estrés salino a diferentes concentraciones de salinidad, donde se muestra el tamaño de la raíz.

Col-0 →

SALK →

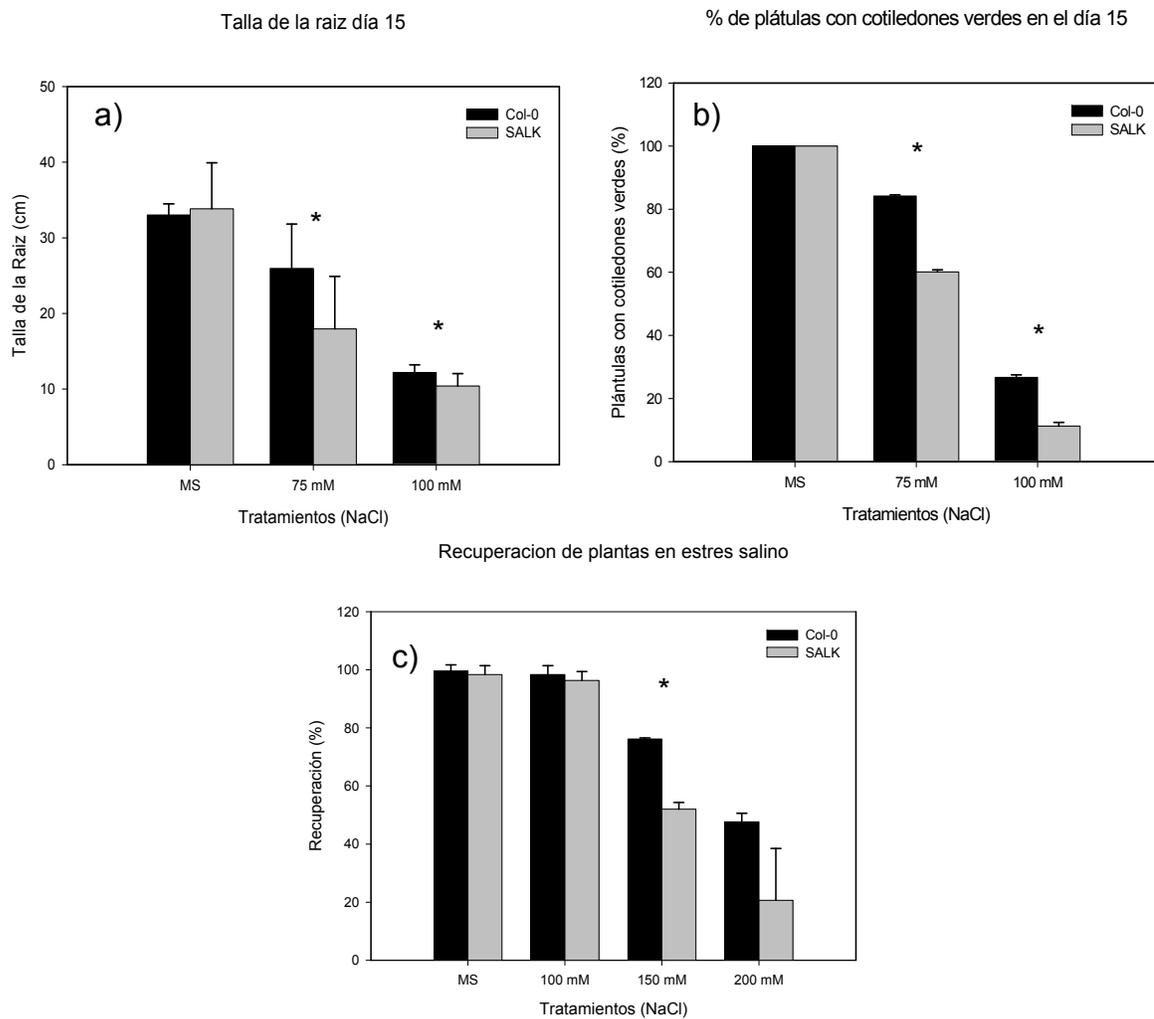


Figura 21. Efecto de la Salinidad por NaCl en plantas SALK y Col 0 de *A. thaliana*. a) Talla de la raíz. b) porcentaje de plántulas con cotiledones verdes. c) porcentaje de recuperación, después de 15 días de germinación en medio MS 50% suplementado con 75, 100, 150 y 200 mM de NaCl. $P < 0.05$ * =Diferencia significativa entre las dos líneas de cada tratamiento.

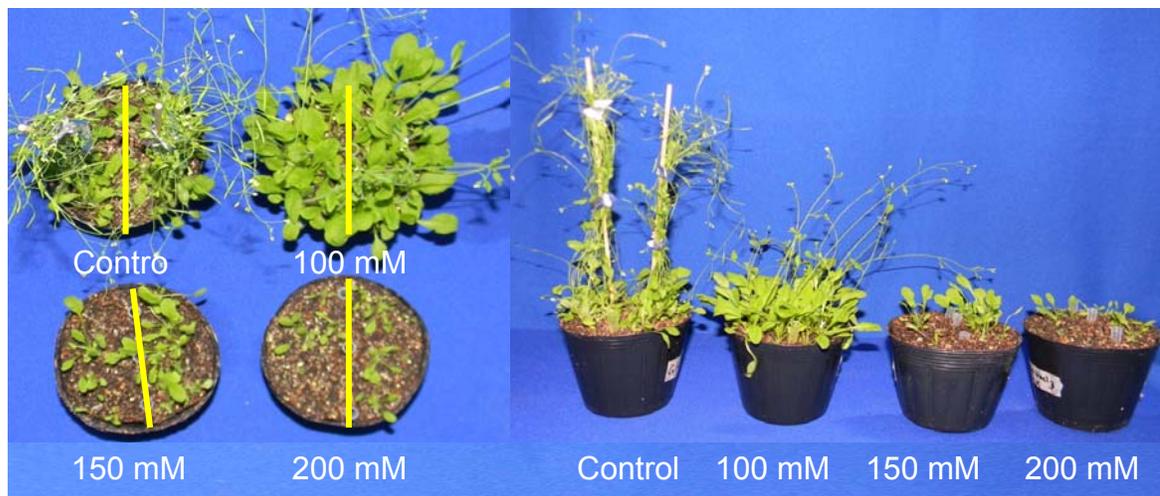
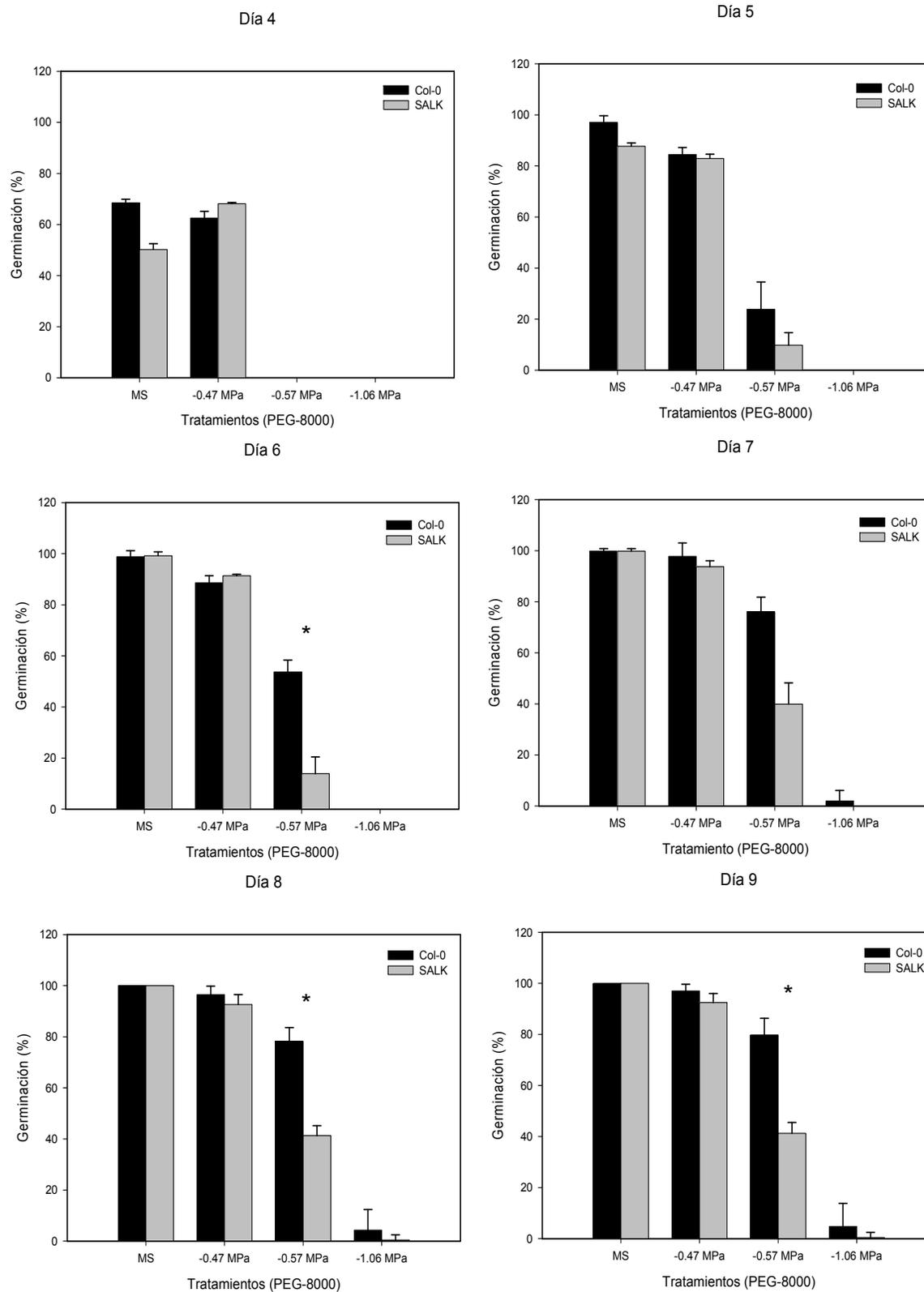


Figura 22. Plantas de *A. thaliana* recuperadas después de 10 días de exposición en diferentes concentraciones de NaCl. En todas las macetas, del lado izquierdo plantas de la línea SALK y del lado derecho las plantas de la línea Col-0.

Para evaluar la funcionalidad de las plantas SALK se realizaron ensayos de germinación bajo estrés osmótico, comparando la línea mutante SALK y plantas de la línea Col-0 en presencia de polietilenglicol (PEG-8000). En este caso se observó un retraso significativo en la germinación de SALK en el tratamiento de PEG-8000 que generó el potencial osmótico de -0.57 MPa, en los días 6, 8, 9, 10 y 11 (Figura 23). En el resto de los tratamientos solo se observó una tendencia a retrasar el tiempo de germinación las semillas de la línea SALK con respecto a la línea Col-0.



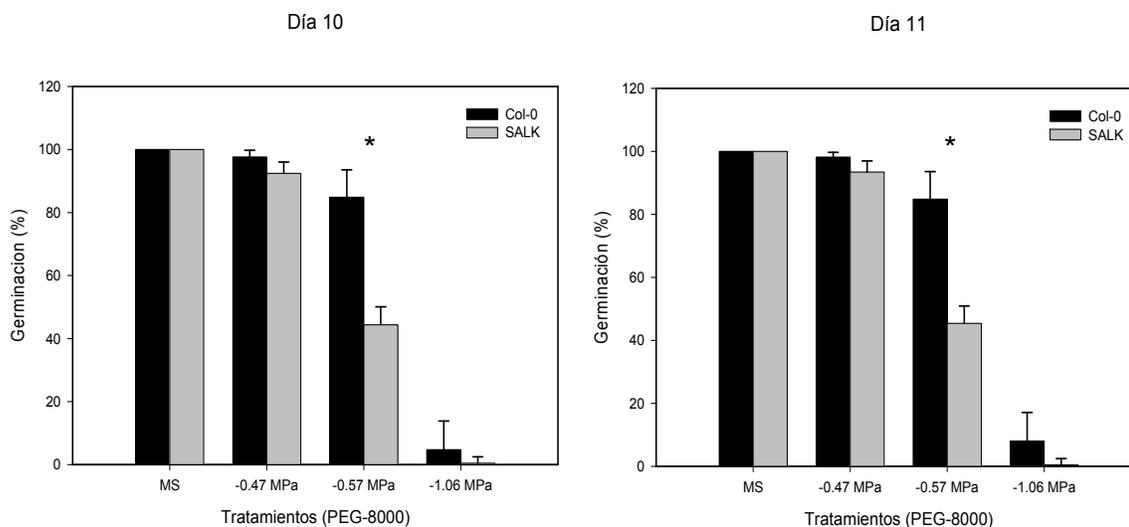


Figura 23. Porcentaje de germinación de *A. thaliana* Col-0 y SALK monitoreado durante 11 días. (Bajo diferentes concentraciones de PEG-8000 250 gr/lit, 400 gr/lit y 550 gr/lit, en medio MS 50%, generando los siguientes potenciales osmóticos -0.47, -0.57 y -1.06 MPa respectivamente). $P < 0.05$ * =Diferencia significativa entre las dos líneas de cada tratamiento.

Las plántulas se dejaron hasta los 15 días de edad en sus respectivos tratamientos, se analizó la talla de la raíz y número de cotiledones verdes; no se observaron diferencias significativas (Figura 24 y 25). Los resultados del ensayo de recuperación mostraron que las plantas SALK tuvieron una recuperación significativamente menor ya que esta presentó una media $41.59\% \pm 1.93$ y 49.69 ± 3.84 y la línea silvestre 64.66 ± 3.13 y 72.10 ± 0.26 , bajo los tratamientos que generaron los potenciales de -0.47 y -0.57 MPa respectivamente (Figura 25 y 26).

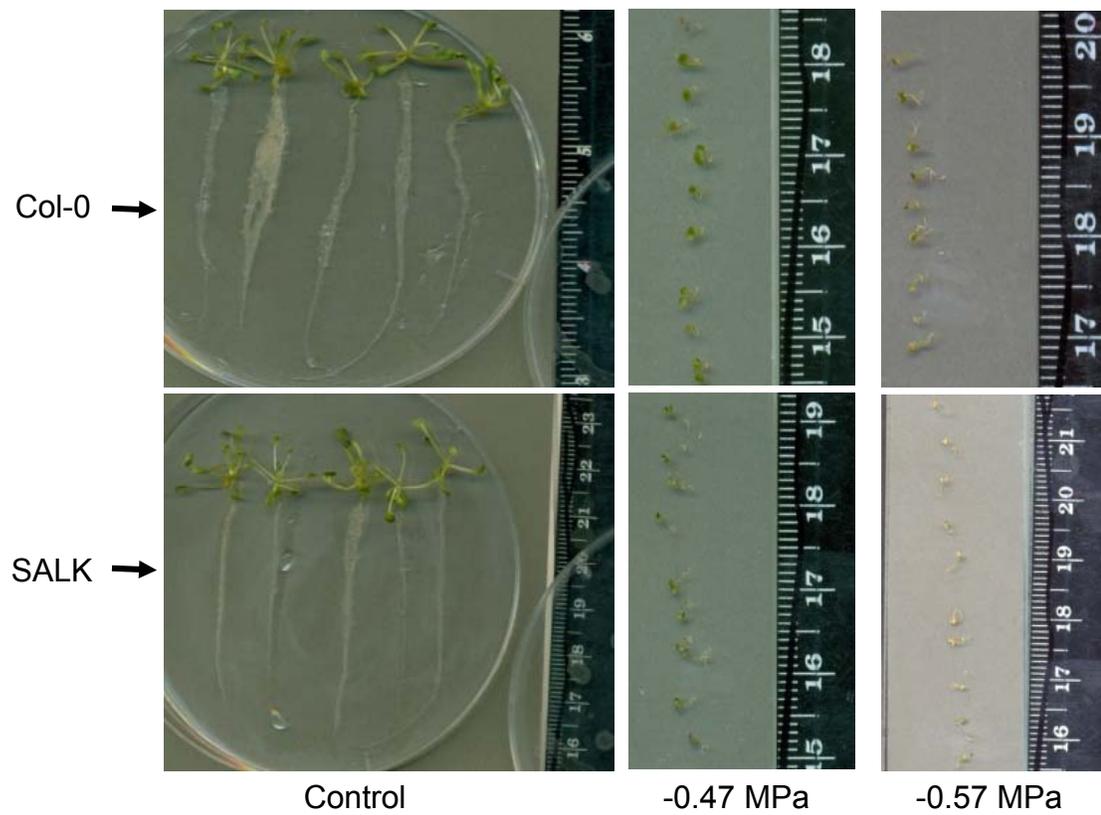


Figura 24. Plántulas de *A. thaliana* después de 15 días de germinadas en estrés osmótico a diferentes concentraciones de PEG-8000, donde se muestra la talla de la raíz.

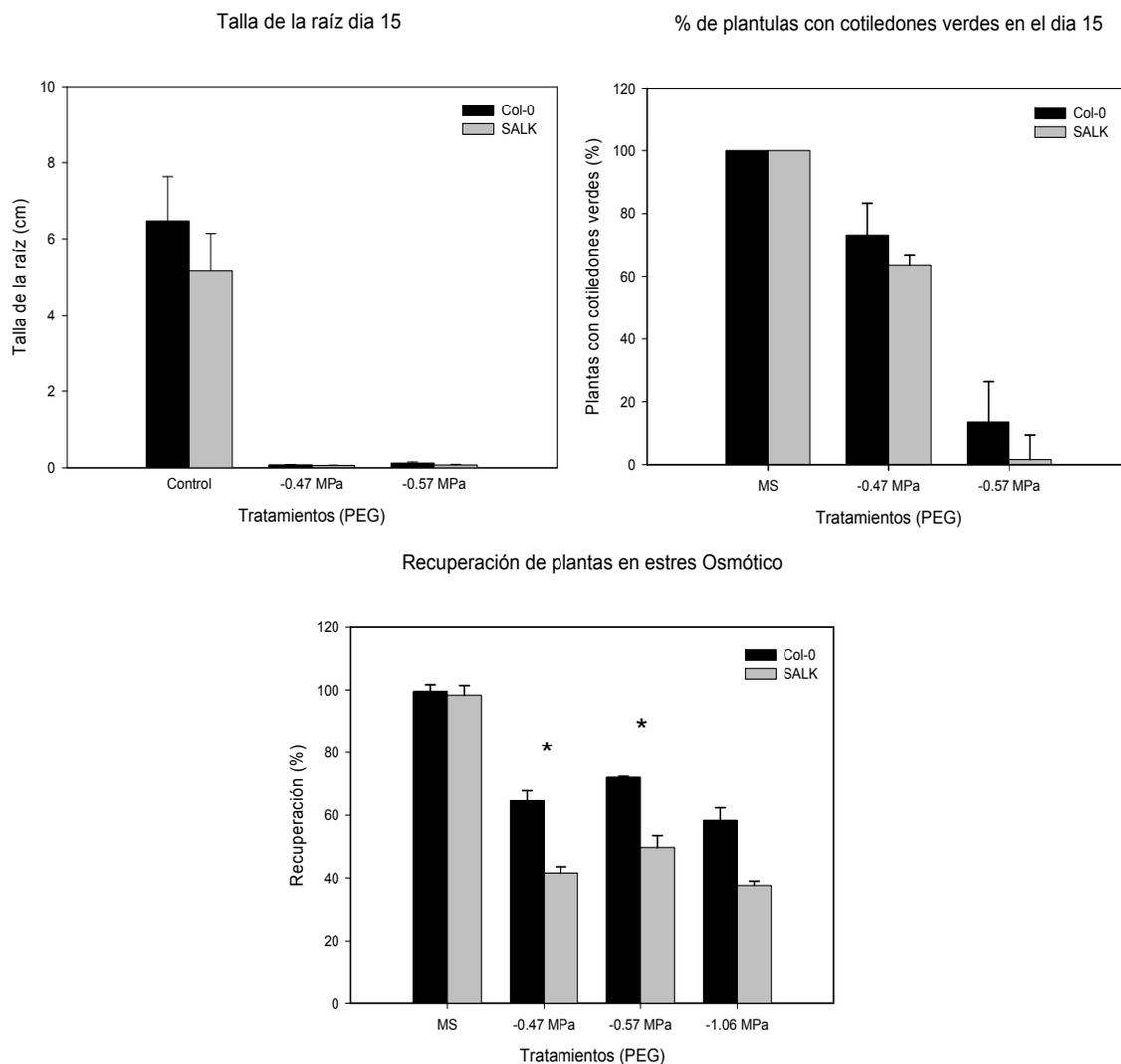


Figura 25. Efecto del estrés osmótico (PEG-8000) en plantas de *A. thaliana*; a) Talla de la raíz; b) porcentaje de plántulas con cotiledones verdes; c) porcentaje de recuperación, después de 15 días de germinación en medio MS 50% suplementado con diferentes concentraciones de PEG-8000 que generaron -0.47, -0.57 y -1.06 MPa de potencial hídrico. $P < 0.05$ * =Diferencia significativa entre las dos líneas de cada tratamiento.

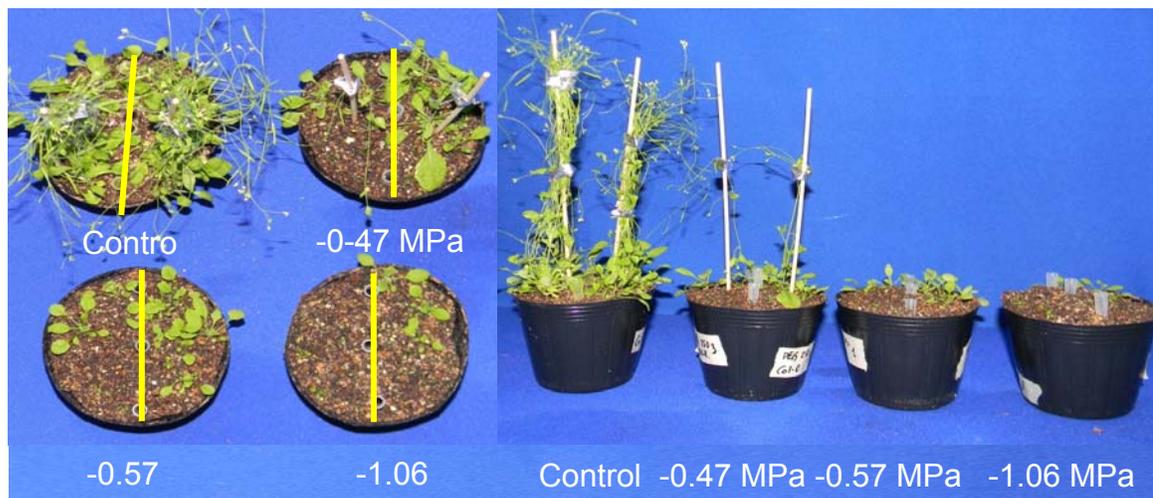


Figura 26. Plantas de *A. thaliana* recuperadas después de 8 días de exposición en diferentes concentraciones de PEG. En todas las macetas, del lado izquierdo plantas de la línea SALK y del lado derecho plantas de la línea Col-0.

7.4 Obtención y evaluación de plantas *A. thaliana* que sobre-expresen el gen *OpsLTP1* bajo estrés salino y osmótico

Se realizó la transformación de *A. thaliana*, mediada por *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción $2X\ 35S::OpsLTP1$ en el vector pMDC32 (Figura 27), por el método de inmersión floral (Figura 28), donde se transformaron 2 macetas de 16 plantas cada una. Se cosecharon las semillas y 2000 de ellas se sembraron en 4 cajas Petri conteniendo medio MS 50%/ 50 μ g/ml higromicina B. Se obtuvieron 4 plantas resistentes a higromicina B, con una eficiencia de transformación del 0.2%; de las 4 plantas transformadas, 3 llegaron a la edad adulta y de éstas se cosecharon semillas de la T₁. Las semillas fueron sembradas en medio MS 50%/ 50 μ g/ml higromicina B, y se verificó la segregación del

transgén mediante la proporción de plantas resistentes al marcador de selección. Posteriormente se trasplantaron en macetas las cuales se dejaron crecer hasta su autofecundación para obtener semilla de la generación T₂. Las semillas T₂ nuevamente se sembraron en medio MS y se obtuvo el porcentaje de germinación en medio MS/ 50µg/ml higromicina B (Anexos A.2). La presencia del transgén se verificó por PCR y secuenciación (Figura 29 y Anexo A.3.). Las plantas que sobre-expresan el gen de *OpsLTP1*, se denominaron Over-*OpsLTP1*.



Figura 27. Geles de agarosa al 1%, a) productos de PCR de 15 colonias de *E. coli* Top 10, transformadas con el vector pCR8GW, se utilizó cebador *OpsLTP* forward y M13 reverse 435 pb, para verificar la dirección de la inserción b) productos de PCR de 15 colonias de *E. coli* Top 10, transformadas con el vector pMDC32 que contienen la ORF del gen *OpsLTP*, se utilizó primer *OpsLTP* forward y *OpsLTP* reverse 364 pb.



Figura 28. Plantas de *A. thaliana* transformadas con la construcción 35S 2X::*OpsLTP1* mediante la técnica de inmersión floral.

7.4.1 Comprobación de los niveles de expresión del transgén por qPCR

Para conocer los niveles de expresión de *OpsLTP1* en las plantas de *A. thaliana* transformadas, se analizaron 6 plantas (T_2) provenientes de 3 líneas Over-*OpsLTP1*. Las plantas 2, 3 y 6 provenientes de las líneas 1 y 3 presentaron los niveles más altos de expresión de *OpsLTP1* (Figura 29). Primeramente se seleccionó la línea P1L5, pero presentaba problemas graves de germinación (70% de germinación), por lo que se seleccionó la planta P3L5 que presentaba 100% de germinación (Tabla de anexos 2), para recuperar semillas T_3 y realizar los bioensayos de estrés abiótico que se describen a continuación.

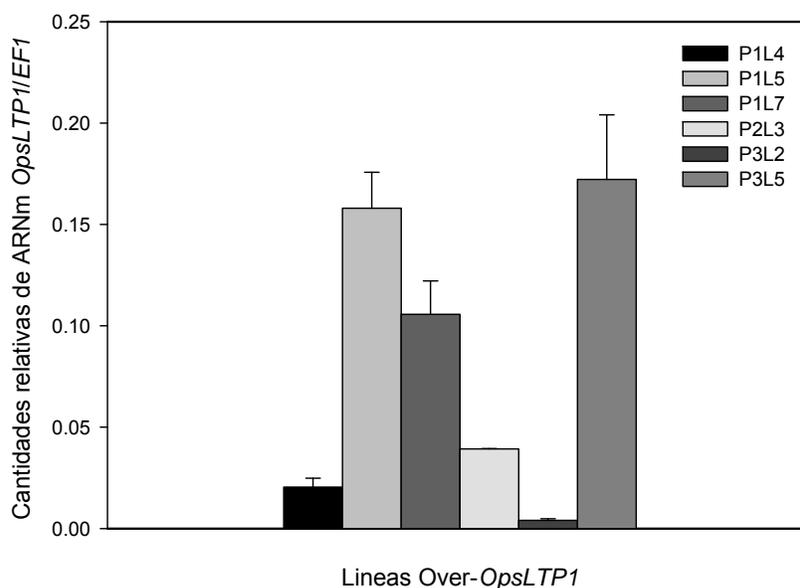
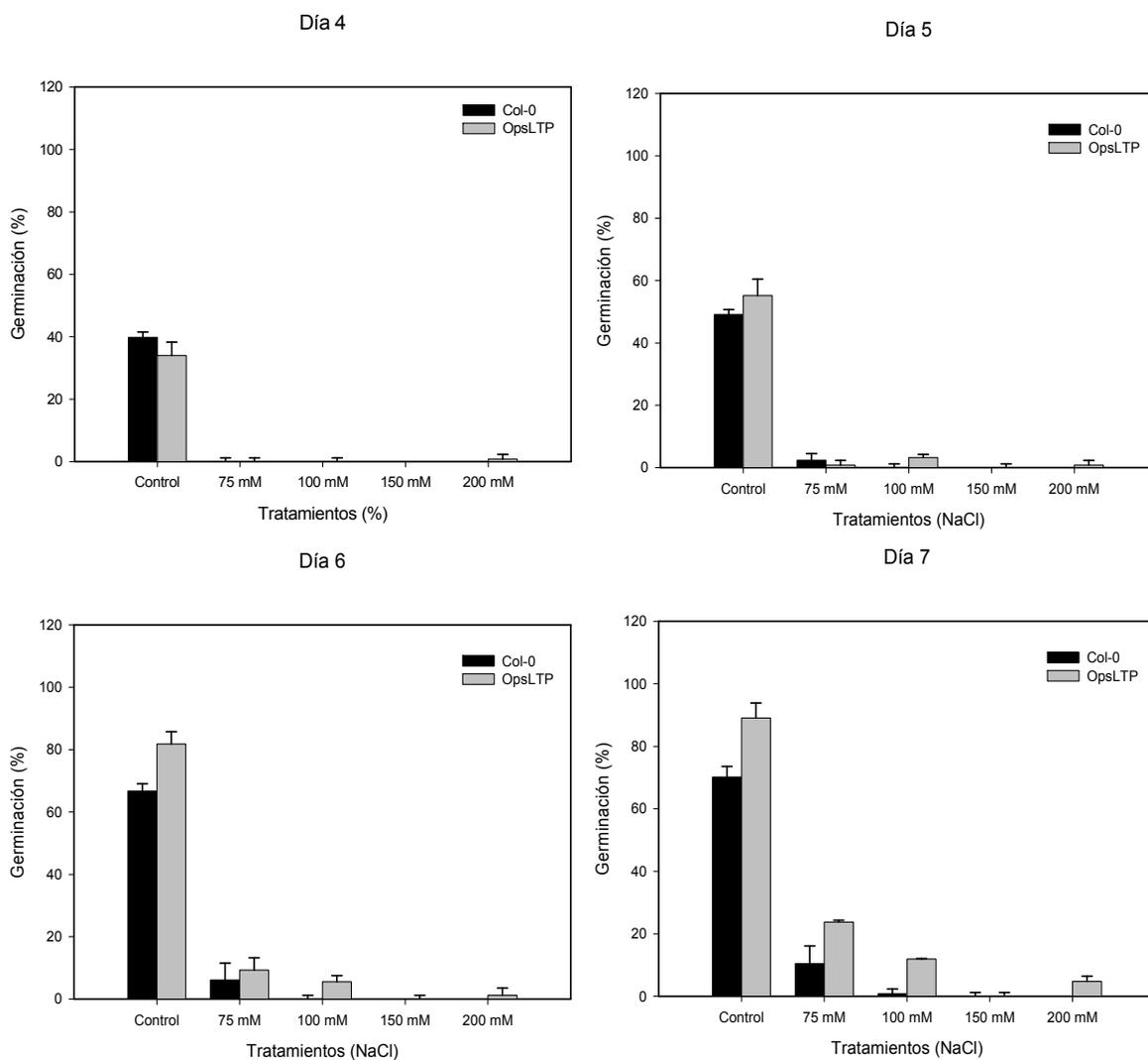


Figura 29. Cuantificación relativa de mRNA de PTL con respecto a EF1 de *A. thaliana* por PCRq. Se analizaron 6 plantas, provenientes de 3 diferentes líneas Over-*OpsLTP1*.

7.4.2 Evaluación de plantas *A. thaliana* que sobre-expresen el gen *OpsLTP1* bajo estrés salino y osmótico

El análisis de la respuesta al estrés salino de plantas de *A. thaliana*, *Over-OpsLTP1* contrastadas con plantas de *A. thaliana* Col-0, con respecto a los ensayos de estrés por salinidad durante la germinación, mostró que las plantas *Over-OpsLTP1* germinan con mayor eficiencia que las Col-0 a partir del día 8 de germinación. En particular, las primeras semillas germinaron al día 4 y las diferencias significativas entre las plantas Col-0 y *Over-OpsLTP1* se observaron en los días 8, 9, 10 y 11, únicamente bajo el tratamiento de 100 mM de NaCl. En general se observó que las plantas *Over-OpsLTP1* sin estrés salino, presentaron mayor porcentaje de germinación que las Col-0, siendo esto significativo a los días 9, 10 y 11 (Figura 30).



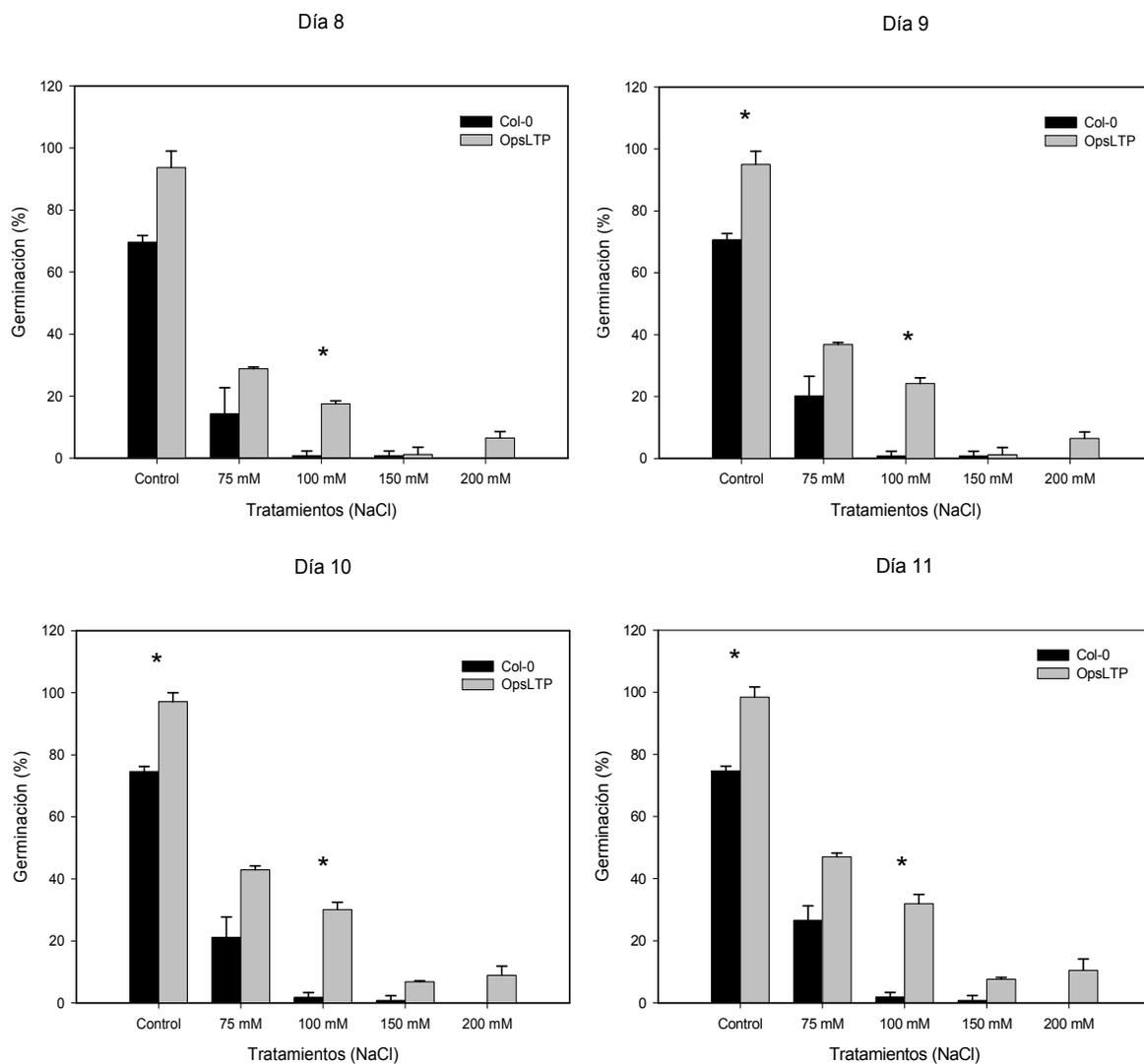


Figura 30. Porcentaje de germinación de *A. thaliana* Col-0 y Over-*OpsLTP1* durante 11 días de muestreo. (Medio MS al 50% bajo diferentes concentraciones de NaCl (75, 100, 150 y 200 mM). $P < 0.05$ * =Diferencia significativa entre las dos líneas de cada tratamiento). $P < 0.05$ * =Diferencia significativa entre las dos líneas de cada tratamiento.

Las plántulas se dejaron crecer por 15 días más en sus respectivos tratamientos, en este caso no se encontraron diferencias en la longitud de la raíz (Figuras 31 y 32), ni el porcentaje de recuperación (Figuras 32 y 33), en plántulas. La evaluación de porcentaje de cotiledones verdes no se realizó, debido a que los cotiledones de las plantas sometidas a estrés salino se necrosaron.

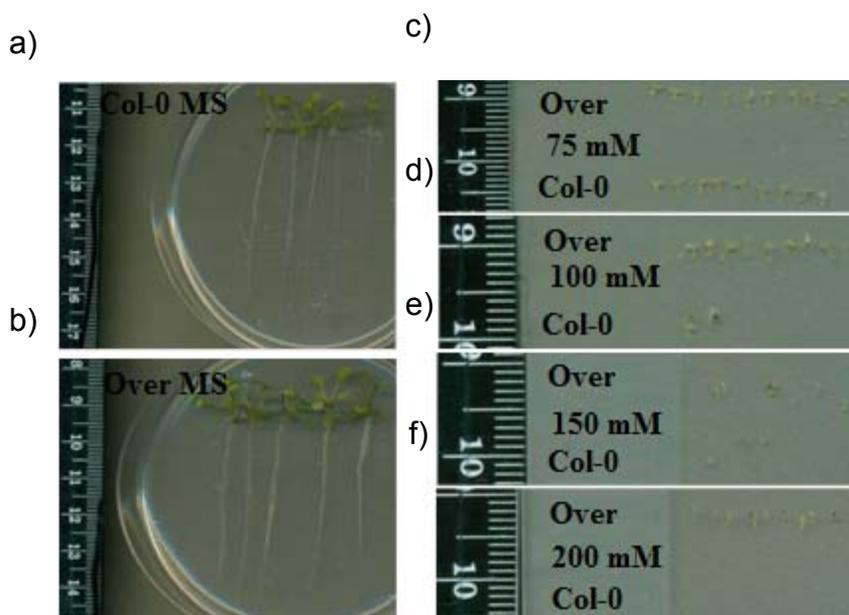


Figura 31. Plántulas de *A. thaliana* después de 15 días de germinadas en estrés salino NaCl, donde se muestra el tamaño de la Raíz. a) Control sin NaCl, plantas Col-0; b) Control sin NaCl, plantas Over-*OpsLTP1*; Tratamientos :c) 75 mM; d) 100 mM; e) 150 mM; y f) 200 mM; de NaCl en plantas Over-*OpsLTP1* y col 0.

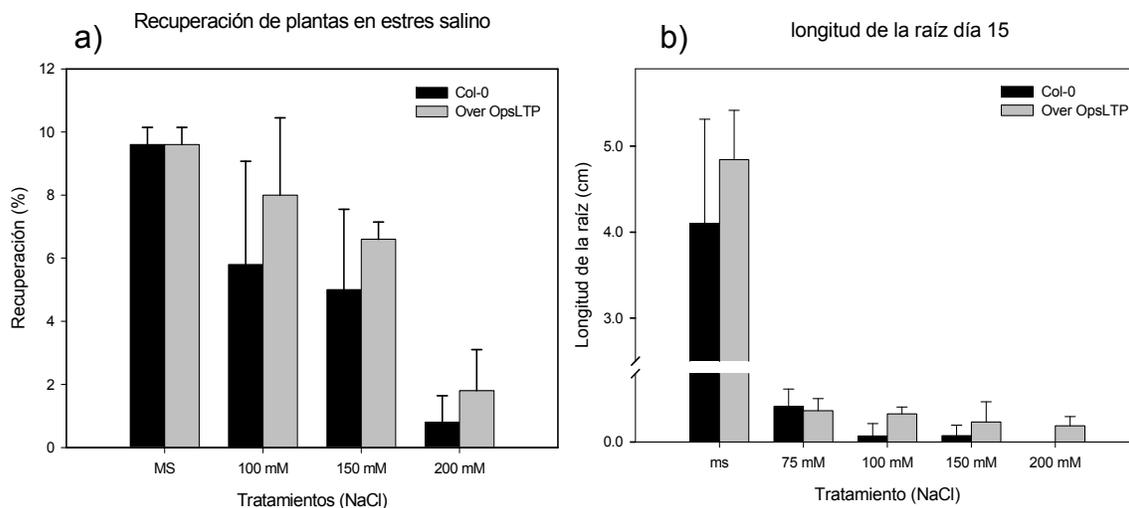


Figura 32. Efecto de la Salinidad por NaCl en plantas *Over-OpsLTP1* y *Col 0* de *A. thaliana*. a) porcentaje de recuperación. b) Talla de la raíz, después de 15 días de germinación en medio MS 50% suplementado con 75, 100, 150 y 200 mM de NaCl.

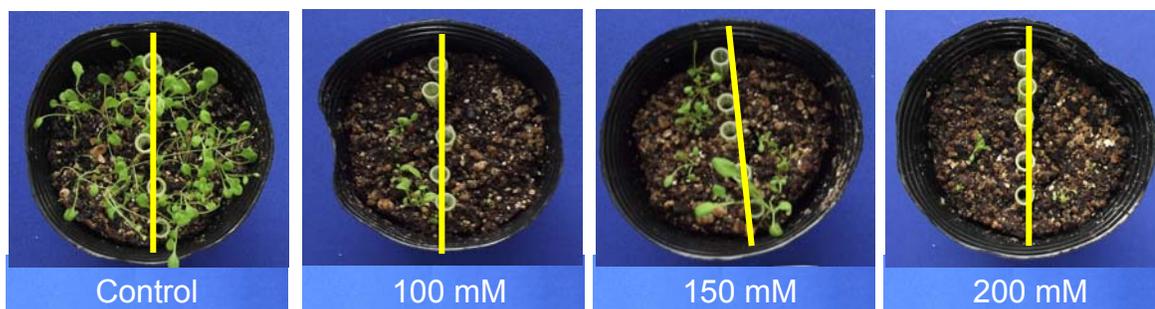
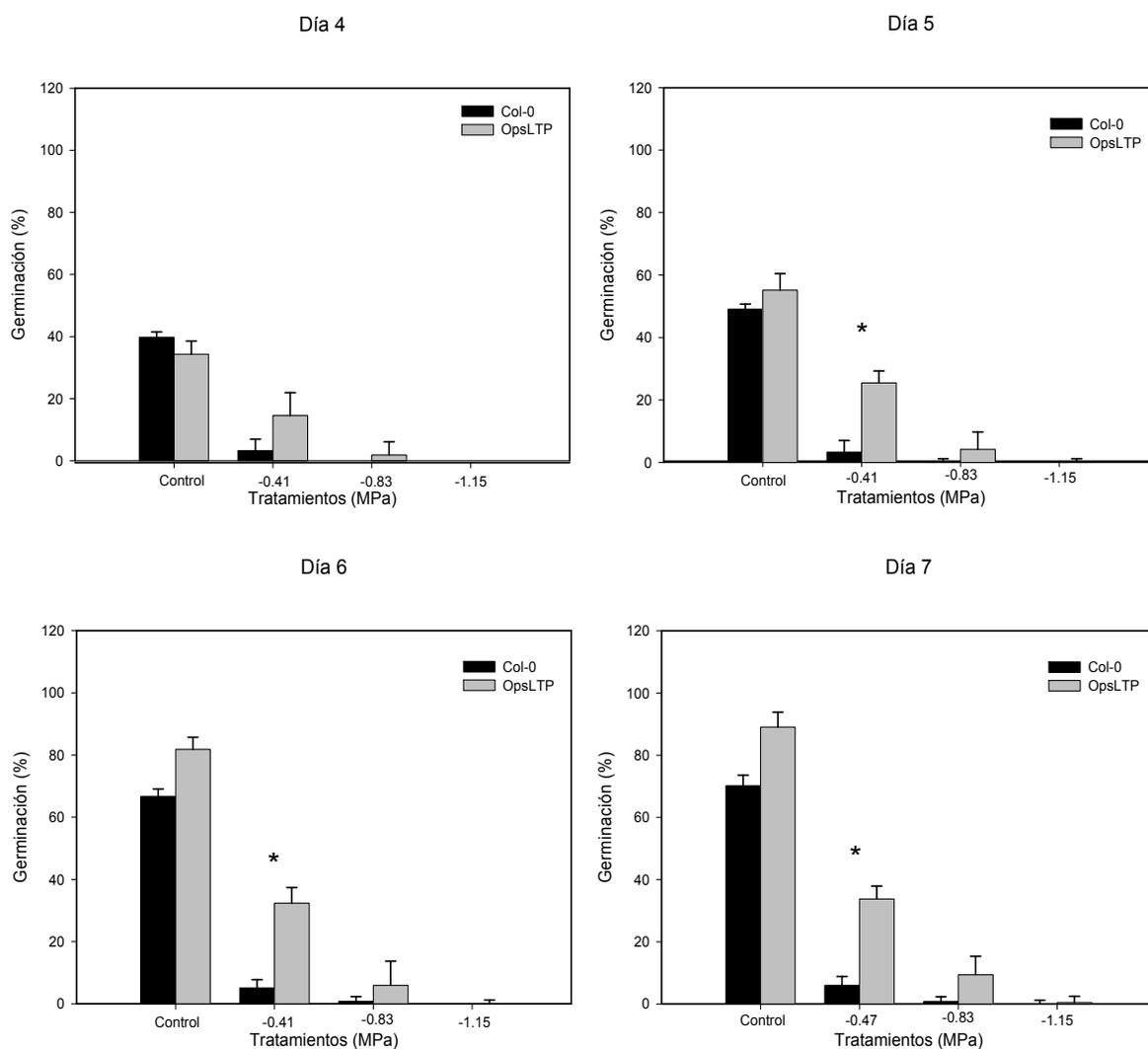


Figura 33. Plantas de *A. thaliana* recuperadas después de 10 días de exposición en diferentes concentraciones de NaCl. En todas las macetas del lado izquierdo plantas de la línea *Over-OpsLTP1* y del lado derecho plantas de la línea *Col-0*.

Los ensayos de germinación bajo estrés osmótico en plantas de *A. thaliana*, *Over-OpsLTP1*, contrastadas con plantas de la línea Col-0 en presencia de polietilenglicol (PEG-8000), los resultados mostraron que la línea *Over-OpsLTP1* germinó mejor que la Col-0. Específicamente se encontraron diferencias significativas en los días 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 de muestreo, en el tratamiento que genero -0.41 MPa. Se lograron identificar. En general las plantas *Over-OpsLTP1* presentaron una germinación significativamente mayor aun en ausencia de PEG en los días 9, 10 y 11 (Figura 34).



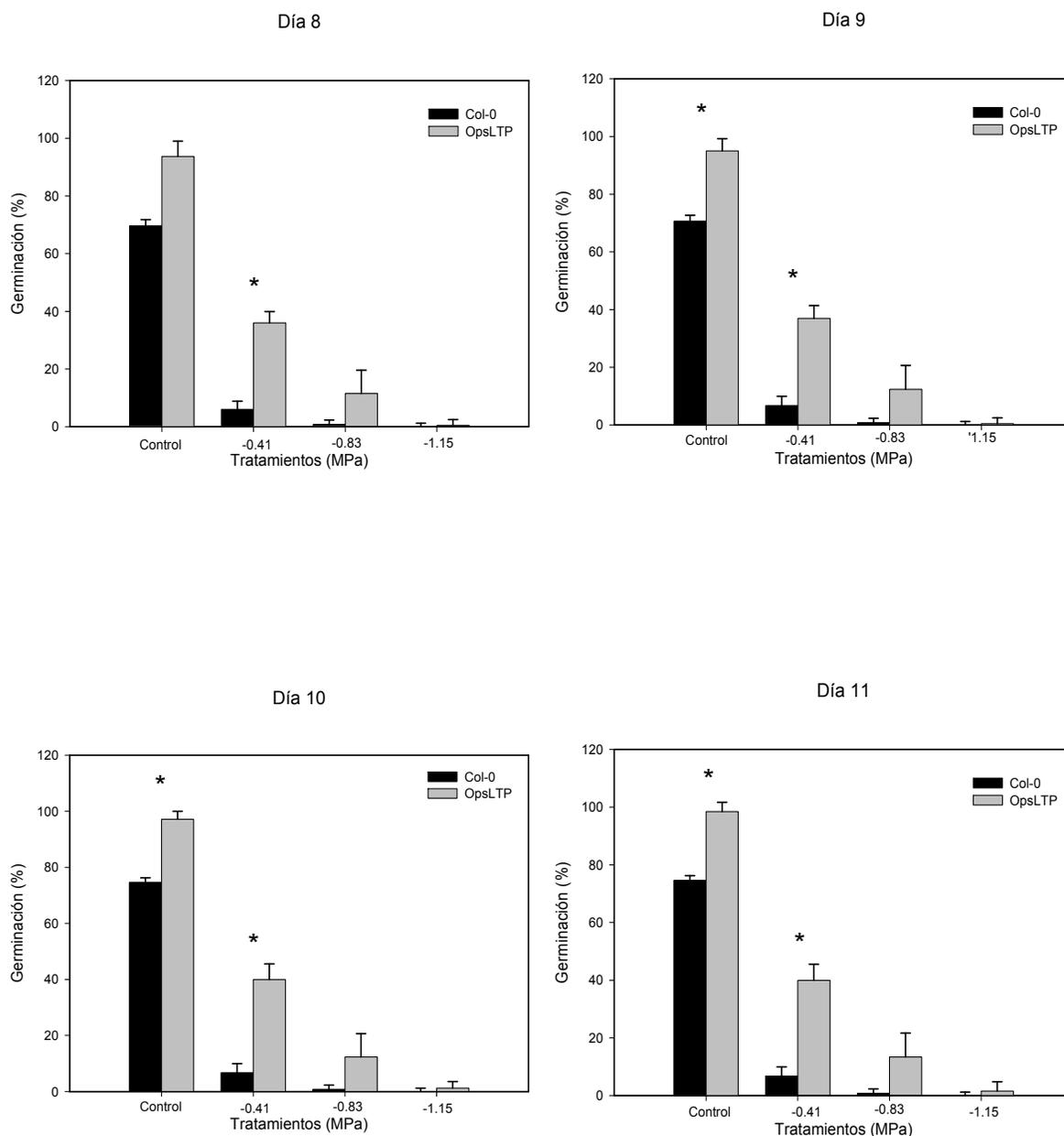


Figura 34. Porcentaje de germinación de *A. thaliana*, Col-0 y Over-*OpsLTP1*, monitoreado durante 11 días, bajo diferentes concentraciones de PEG-8000 250 gr/lit, 400 gr/lit y 550 gr/lit, en medio MS 50%, las cuales generaron los siguientes potenciales osmóticos respectivamente -0.41, -0.83 y -1.15 MPa. $P < 0.05$ * =Diferencia significativa entre las dos líneas de cada tratamiento.

Las plántulas se dejaron crecer hasta los 15 días de edad en sus respectivos tratamientos de estrés y se evaluó el desarrollo de la raíz (Figura 35 y 36) y porcentaje de recuperación (Figura 36 y 37), no se encontraron diferencias significativas entre las *Over-OpsLTP1* y las Col-0. En cuanto al conteo de organismos que presentaban cotiledones verdes no fue posible realizarlo ya que todos los individuos se encontraban necrosados.

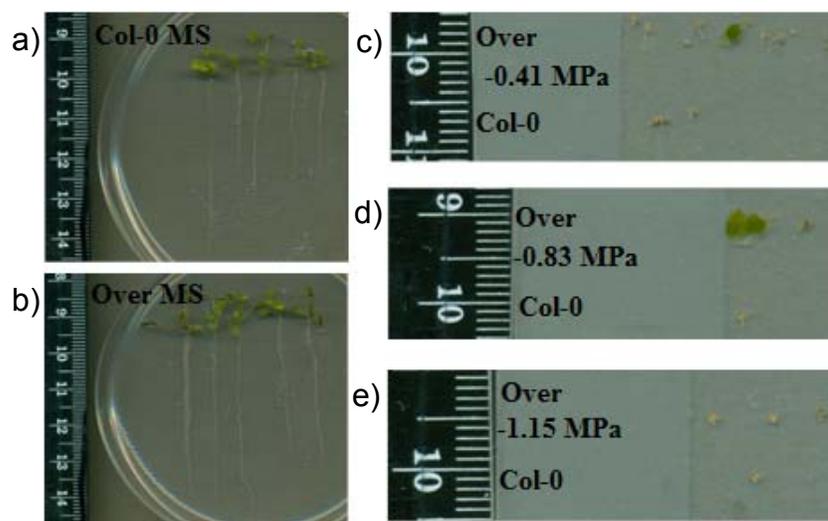


Figura 35. Plántulas de *A. thaliana* después de 15 días de germinadas en estrés osmótico a diferentes concentraciones de PEG-8000, donde se muestra el tamaño de la Raíz. a) tratamiento control, plantas Col-0. b) tratamiento control. Plantas *Over-OpsLTP1*. c) tratamiento -0.41 MPa; d) -0.83 MPa; e) -1.15 MPa.

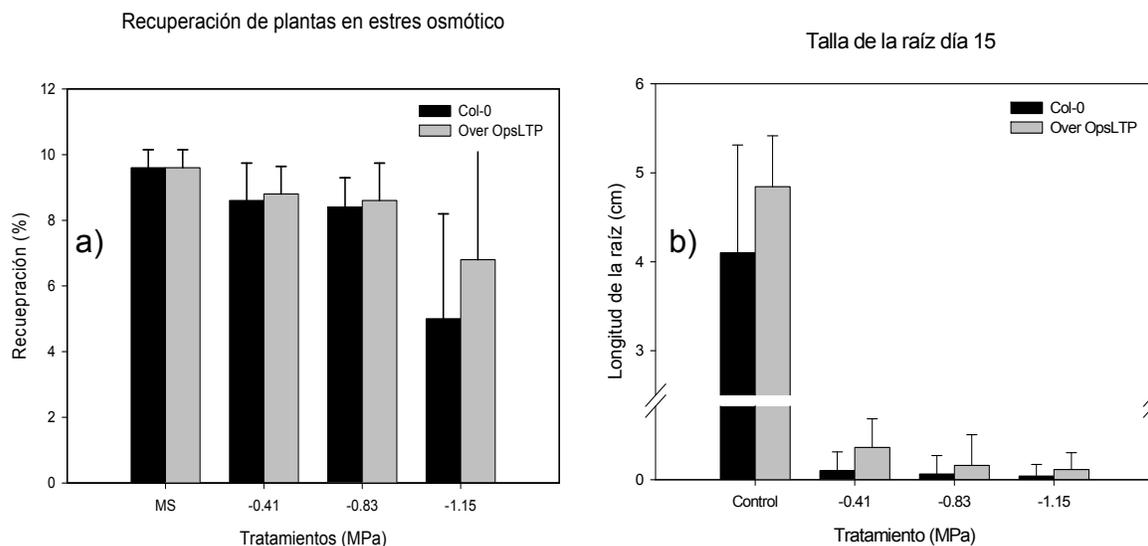


figura 36. Efecto del estrés osmótico en plantas *Over-OpsLTP1* y *Col-0* de *A. thaliana*. a) porcentaje de recuperación. En plántulas de *A. thaliana*; b) Talla de la raíz, después de 15 días de germinación en medio MS 50% suplementado con diferentes concentraciones de PEG-8000 que generaron -0.47, -0.57 y -1.06 MPa de potencial hídrico.

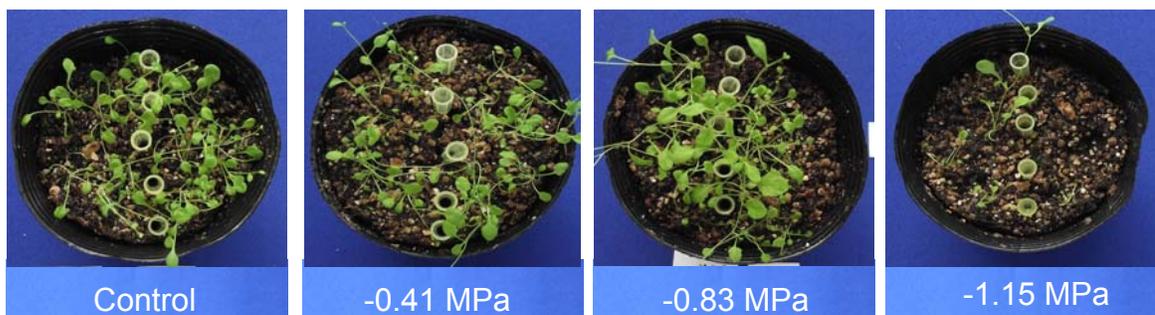


Figura 37. Plantas de *A. thaliana* recuperadas después de 10 días de exposición en diferentes concentraciones de PEG-8000, en todas las macetas del lado izquierdo plantas de la línea *Over-OpsLTP1* y del lado derecho plantas de la línea *Col-0*.

7.5 Estrés térmico (-20 °C)

Se realizó ensayo de estrés por congelamiento en plantas de *A. thaliana*, Col-0, SALK_095248 y Over-*OpsLTP1* de 1 mes de edad. El tratamiento se realizó por quintuplicado con 10 organismos de cada línea para cada replica, una vez realizado el ensayo y con el tiempo de recuperación se estimó el porcentaje de sobrevivencia (Fig. 38 y 39):

Ensayo de congelamiento (recuperación despues de 15 dias del ensayo)

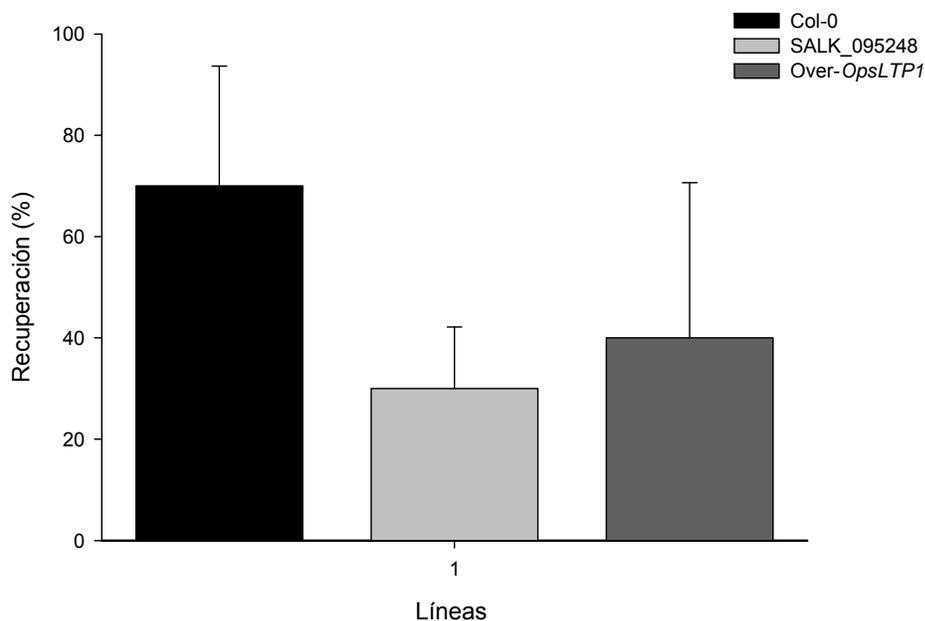


Figura 38. Porcentajes de germinación de SALK, Over-*OpsLTP1* y Col-0 en respuesta a estrés por congelamiento. No se encontraron diferencias significativas

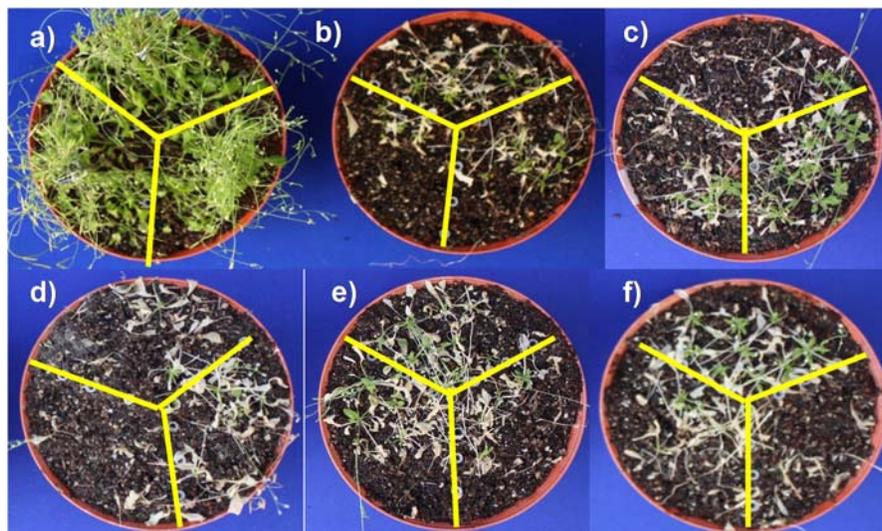


Figura 39. Plantas de de *A. thaliana* después de 15 días de recuperación del estrés a -20 °C. a) Control (sin tratamiento). b), c), d), e) y f) Tratamientos a -20 °C, en todas las macetas en la parte superior se encuentran las plantas Col-0, inferior derecho SALK_095248 e inferior izquierdo Over-*OpsLTP1*.

4.6 Talla de la semilla

Con la finalidad de conocer si la mutación o sobre expresión de una LTP producía alguna diferencia morfológica en las semillas de *A. thaliana*, se tomaron fotografías en microscopio electrónico. Se cuantificó el diámetro menor y mayor de las semillas de la línea SALK, Over-*OpsLTP1* y Col-0. Se encontraron diferencias significativas en la medición del diámetro menor, aunque en el diámetro mayor no se encontraron diferencias significativas (Figura 40).

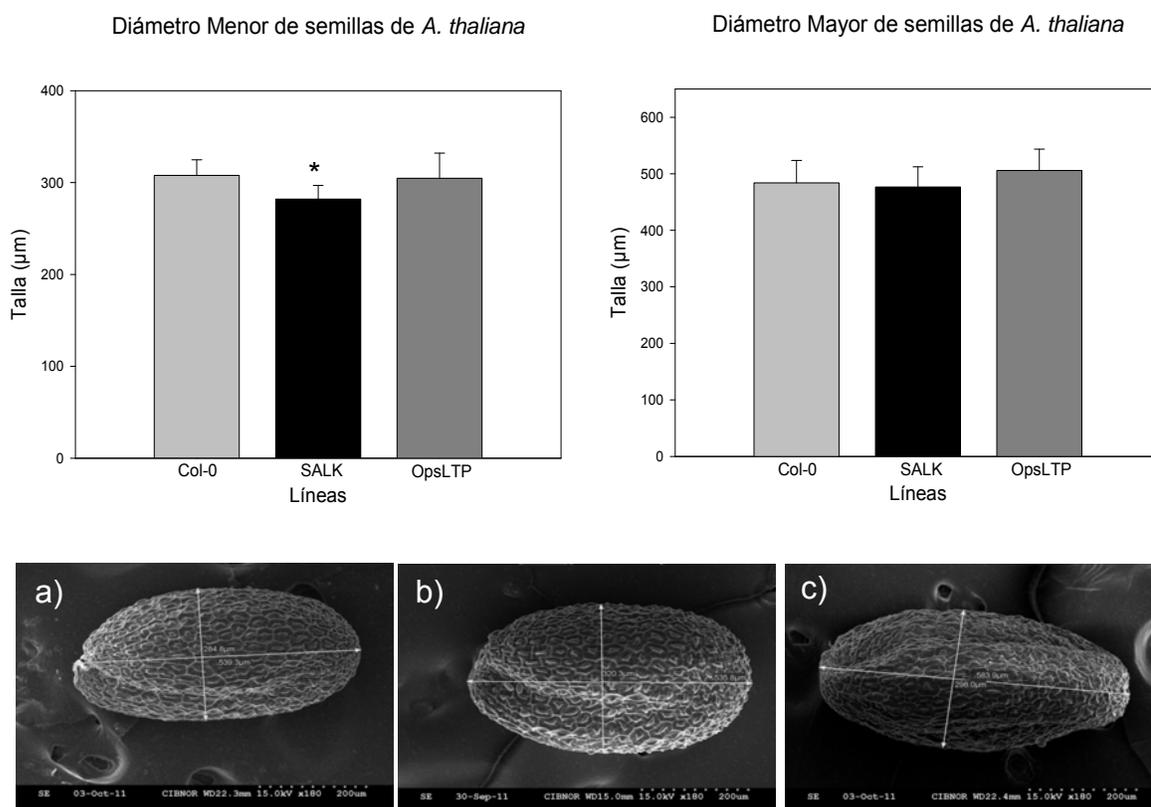


Figura 40. Tamaño de las semillas. a) Gráficos donde se muestran los diámetros de las semillas tanto el diámetro menor como el diámetro mayor; b) Imágenes de semillas de las líneas: a) Col-0, b) SALK_095248 y c) Over-*OpsLTP1*. $P < 0.05$ * =Diferencia significativa entre las dos líneas de cada tratamiento.

8 DISCUSIÓN

Se ha demostrado la funcionalidad de las proteínas transportadoras de lípidos *in vitro*, de allí su nombre (Kader, 1996), pero se desconoce con precisión cuál es su papel durante el estrés salino (Wang *et al.*, 2008). Algunas funciones sugeridas son basadas en la inducción de la expresión de genes en respuesta a ácido abscísico (Arondel *et al.*, 2000; Yubero-Serrano *et al.*, 2003), bajas temperaturas (Hincha *et al.*, 2001), sequia (Treviño y O'Connell, 1998; Cameron *et al.*, 2006) y salinidad (Claude, 1996; Dani *et al.*, 2005; Ai-li *et al.*, 2006). En el presente trabajo encontramos que la *OpsLTP1* está involucrada en los mecanismos de estrés iónico y osmótico de las plantas.

El análisis de la secuencia deducida de aminoácidos obtenida del gen de *OpsLTP1* mostró 55% de identidad con *AtLTP3*, porcentaje comúnmente observado en alineamiento múltiple entre LTPs del genoma de *A. thaliana* dónde se reportan identidades del 47 a 56% (Arondel *et al.*, 2000; Jensen *et al.*, 2003). Se localizaron 8 residuos de cisteína característicos de las LTPs (Kader, 1996), así como también los aminoácidos Val₆, Aromático₁₃, Gly₃₀, Hidrofóbico₃₄, Leu/Ile₅₁, Lys₅₂, Ala₆₆, Val₇₂, Hidrofóbico₇₇, Aromático₇₉, Ile₈₁ y Ser₈₂, característicos de las LTPs de la familia 1 (Yeats y Rose, 2007). En la secuencia se identificaron también dos pentapéptidos consenso T/S-X-X-D-R/K y P-Y-X-I-S (Carvalho y Gómez, 2007), un péptido señal de aproximadamente 26 aminoácidos que direcciona a la proteína a espacio extracelular (Thoma, 1993) y los residuos de cisteína involucrados en la formación de puentes disulfuro (Samuel *et al.*, 2002).

8.1 Evaluación funcional del gen *OpsLTP1* en *S. cerevisiae* W303-1A bajo estrés abiótico.

S. cerevisiae se ha utilizado para evaluar funcionalidad de genes de plantas (Yesilirmak y Sayers, 2009), debido a que son organismos eucariotas unicelulares

con características moleculares y genéticas similares a los eucariotas superiores; Además de crecer rápidamente, ser de fácil manejo y utilizar medios de cultivo de bajo costo (Frommer y Ninnemann, 1995). La evaluación funcional del gen *OpsLTP1* en levadura, bajo estrés por congelamiento, salinidad y alcalinidad, mostró diferencias significativas únicamente en tratamiento salino y congelamiento. Si bien las diferencias entre los cultivos control y los cultivos con la construcción *pYES2.1::OpsLTP1* tuvieron un valor de $p < 0.05$, estas diferencias no fueron lo suficientemente grandes para proponer que este gen se encuentre involucrado en algún mecanismo de tolerancia al estrés en el sistema *S. cerevisiae* (Karlgrén *et al.*, 2005; Xu *et al.*, 2008). Lo anterior podría deberse a que *S. cerevisiae* presenta mecanismos distintos a las plantas, por ejemplo: Kader (1996) menciona que en *S. cerevisiae* existen proteínas análogas llamadas Proteína transportadora de Fosfatidinositol (PI-TP) que se encargan del transporte de lípidos entre membranas subcelulares, por lo tanto la incorporación de *OpsLTP1* no le estaría proporcionando alguna ventaja adicional en cuanto a su respuesta al estrés. Por otra parte Gorjanovic *et al.* (2004) observó que una LTP de granos de cebada en los procesos de fermentación provocó que disminuyera significativamente la fermentación así como la respiración de levaduras de *S. cerevisiae*; por lo tanto la sobre-expresión de *OpsLTP1* podría estar afectando su metabolismo y limitando su capacidad de respuesta ante el estrés abiótico. Así mismo, aunque la sobre-expresión de la *OpsLTP1* no genera una cantidad de proteína LTP que afecte el crecimiento, puede llegar a afectar su sobrevivencia pues se ha sugerido que este tipo de proteínas tienen una actividad antifúngica *in vitro* sobre *S. cerevisiae* (Wang *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2008). Finalmente *OpsLTP1* es una proteína con un péptido señal que la dirige al espacio extracelular por lo cual habrá que determinar si en el sistema de levadura permanece intracelularmente o es expulsada.

8.2 Evaluación funcional del gen *OpsLTP1* en *A. thaliana* bajo estrés abiótico.

El gen *AtLTP3* se expresa mayoritariamente en los primeros estadios de maduración del fruto así como en las primeras etapas de formación de los embriones (Winter *et al.*, 2007). Nuestros resultados en medición del diámetro mayor y menor de las semillas SALK y *Over-OpsLTP1* mostraron diferencias significativas en el diámetro menor de las semillas SALK. Lo anterior es claro considerando que los lípidos en la semilla representan el 40% de la masa (Eastmond y Graham, 2001) y la ausencia de *AtLTP3* puede generar deficiencias en el desarrollo y maduración del embrión y de la semilla.

En el presente trabajo se decidió investigar más a detalle el efecto del NaCl y PEG en la germinación y desarrollo de la raíz. Los resultados indican que la LTP está involucrada en los procesos de germinación, y se encontró que en plantas Col-0 presentaron un decremento en el porcentaje de germinación (24.3%) con respecto a las *Over-OpsLTP1* aún en condiciones control en comparación que las col-0. Particularmente se observó que las plantas SALK presentan un retraso en germinación presencia de NaCl y PEG a diferencia de las *Over-OpsLTP1* que presentaron un incremento en el promedio de germinación comparado con col-0. Si bien se desconoce el papel exacto que desempeñan las LTP durante el estrés salino (Wang *et al.*, 2008), se han sugerido algunas funciones basadas en la expresión de genes que pudieran estar relacionadas con los procesos de germinación (Kader, 1996; Dani *et al.*, 2005; Ai-li *et al.*, 2006). Durante la germinación de semillas de *Helianthus annuus* se ha encontrado la expresión de una LTP y su aumento en la expresión cuando estas están sujetas a estrés salino y ABA al menos durante los primeros 15 días después de ser embebidas en agua (Gonorazky *et al.*, 2005). Pagnussat *et al.* (2009) demostraron que algunas LTPs se encuentran tanto en la región subcelular como en la región extracelular por lo que sugieren que ésta debe de estar envuelta en el tráfico de lípidos y debe de tener alguna función durante la maduración de la semilla y la germinación. Eklund

y Edqvist (2003) mencionan que una vez que los nutrientes se han agotado en el endospermo las células entran en fase de muerte celular programada e infiere que algunas LTPs pueden estar involucradas en el reciclamiento de lípidos de estas células hacia lugares donde hay crecimiento epidérmico y el desarrollo. Lo anterior probablemente esta sucediendo en semillas de *Arabidopsis thaliana* ya que coincide con algunos resultados encontrados en el presente trabajo. Por ejemplo, como se mencionó en la región regulatoria del gen de *OpsLTP1* se detectaron, por análisis *in silico*, elementos cis-actina OS~Skn-1_Motif que es un elemento regulatorio cis-actina que es requerido para expresión en el endospermo (Takaiwa *et al.*, 1991). La base de datos de microarreglos de la Universidad de Toronto, revela que durante el desarrollo de la planta, *AtLTP3* se expresa en mayor cantidad en estadios tempranos de desarrollo de las silicuas, coincidiendo también con las primeras etapas de desarrollo del embrión en las semillas. Clark y Bohnert (1999), refieren que la expresión de *AtLTP3*, se presenta en meristemas, flores y semillas en desarrollo, también en el segmento corto del brote cerca del meristemo de floración, y no detectaron expresión en raíces de 1 a 5 días de edad. Sin embargo, Chae *et al.* (2010) encuentran que el gen *AtLTP3* se expresa en estípulas, en la punta de la raíz primaria en el primer día después de germinada la semilla, así como en los sitios de iniciación de raíces secundarias en los primeros 5 días después de la germinación. Nuestros resultados se relacionan con lo obtenido por Chae *et al.* (2010) ya que al menos en la línea SALK en estrés salino la talla de la raíz se vio afectada (reducción de la raíz) por lo que probablemente este gen participe en algún mecanismo de respuesta al estrés en la raíz y de esta manera se vea afectada la elongación de esta.

Está demostrado que la expresión de *AtLTP3* se da mayoritariamente en la parte radicular de la planta bajo diferentes tipos de estrés abiótico (Kilian *et al.*, 2007); lo cual puede explicar los resultados obtenidos en las plantas SALK, en donde se encontró que el estrés iónico afecta la talla de la raíz y el número de cotiledones verdes. Wang *et al.* (2009) al analizar los perfiles de expresión de 14 genes que

codifican para LTPs de *Tamarix hispida*, bajo diferentes tipos de estrés abiótico encontró que algunos genes se expresan en partes aéreas y otros en la raíz. De manera particular los resultados muestran diferencias significativas en el efecto del NaCl en las plantas SALK, como ya se menciona tanto en la parte aérea (cotiledones verdes) y en la región radicular (longitud de la raíz). En concordancia con ello, se encontró además elementos reguladores en la secuencia de *OpsLTP1* que le permiten responder a diferentes tipos de estrés abiótico. Por ejemplo: el elemento AT~ABRE que se encuentra involucrado en respuesta a ABA (Yamaguchi-Shinozaki y Shinnozaki., 1993) y cuya funcionalidad se relaciona a lo observado por Wenzel *et al.* (2008) que reportó el aumento en los niveles de expresión en el gen *AtLTP3* bajo la presencia de 2-4-D, ABA, y sacarosa; y aunque en este trabajo no se evaluaron esos estresores, se sabe que este elemento participa en la regulación de genes de respuesta diversos tipos de estrés ambiental (Tuteja *et al.*, 2007) como puede ser salinidad y sequía. El otro elemento relacionado es el AT~MBS_1 que es inducible en respuesta por sequía (Yamaguchi-Shinozaki y Shinnozaki, 1993) cuya actividad podría estar involucrada en los resultados encontrados usando PEG en el presente trabajo. No obstante sería necesario realizar experimentos *in vivo* de estrés abiótico para comprobar la participación de los elementos encontrados en la secuencia río arriba del gen *AtLTP3* en el análisis *in silico*.

En estrés por congelamiento no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de recuperación de las plantas SALK y *Over-OpsLTP1*, pero se observó que las SALK se vieron más afectadas que las *Over-OpsLTP1* y las Col-0. El resultado anterior concuerda con el análisis bioinformático de la región promotora, donde no se encontraron elementos regulatorios en respuesta a estrés por congelamiento. Por el contrario, la predicción bioinformática indica un elemento BO~HSE que está involucrado en aumentar los niveles de expresión durante eventos de choque térmico (altas temperaturas) (Gurley y Key, 1991) que no fue evaluado en el presente trabajo. El análisis de la región promotora de

AtLTP3 también mostró elementos cis-actina envueltos en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico y a diferentes fitohormonas. Al igual que los resultados observados en este trabajo, Jung *et al.* (2006) observó que en una LTP de *Caspsicum annuum* se encuentra fuertemente expresada por etileno, ABA, y estresores abióticos como: sequía, salinidad, bajas temperaturas y daño mecánico.

9. CONCLUSIÓN

En conclusión, el gen que codifica para la *OpsLTP1* es un gen inducible y altamente regulado, involucrado en los procesos de germinación, en el fenotipo del tamaño de la semilla y en la talla de la raíz durante el establecimiento de la plántula en respuesta al estrés salino y osmótico, pero no en el estrés por congelamiento en *A. thaliana*. Por otra parte en plántulas se presentaron fenotipos con menor porcentaje de recuperación en plantas SALK lo que sugiere que este gen también se encuentre involucrado en algún mecanismo de respuesta al estrés abiótico.

9. LITERATURA CITADA

Adams P., Nelson D.E., Yamada S., Chmara W., Jensen R.G. y Griffiths H. 1998. Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae). *New Phytol.* 138 (2): 171-190.

Ai-li L., Cheng-Sheng M., Rong-hua Z., Zhi-Ying M. y Ji-Zeng J. 2006. Assessment of lipid transfer (LTP1) gene in wheat powdery mildew resistance. *Agr Sci China.* 5 (4): 101-105

Arondel V., Vergnolle C., Cantrel C. y Kader J.-C. 2000. Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 157 (1): 1-12.

Azcón-Bieto J. y Talón M. 2000. Relaciones Idirecas en: *Fundamentos de fisiología vegetal*. McGraw-Hill/Interamericana. Madrid España. 17-64

Bellon M.R. 2009. Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas cultivadas, en *Capital natural de México*, vol. II: Estado de conservación y tendencias de cambio. Conabio, México, pp. 355-382.

Biswal B., Joshi P.N., Raval M.K. y Biswal U.S. 2011. Photosynthesis, a global sensor of environmental stress in green plants: stress signaling and adaptation. *Curr Sci India.* 101 (1): 47-56

Bohnert H.J. y Cushman J.C. 2000. The ice plant *Cometh*: Lessons in abiotic stress tolerance. *J. Plant Growth Reg.* 19. 334-346

Borsani O., Valpuesta V. y Botella M.A. 2003. Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *Plant Cell. Tiss Org Culture.* 73. 101-105

Bubier J. y Schlappi M. 2004. Cold induction of EARL11, a putative *Arabidopsis* Lipid transfer protein, is light and calcium dependent. *Plant Cell Environ.* 27 (7). 929-936

Cameron K.D., Teece M.A. y Smart L.B. 2006. Increased accumulation of cuticular wax and expression of lipid transfer protein in response to periodic drying events in leaves of tree tobacco. *Plant Physiol.* 140 (1): 176-183.

Carvalho A.O. y Gomez V.M. 2007. Role of lipid transfer proteins in plant plant cell physiology-A concise review. *Peptides.* 28. 1144-1153

Chae K., Gonong B.J., Kim S.-C., Kieslich C.A., Morikis D., Balasubramanian. y Lord E.M. 2010. A multifaceted study of stigma/style Cysteine-rich adhesin (SCA)-like *Arabidopsis* lipid transfer protein (LTPs) in plant growth and reproduction. *J Exp Bot.* 61 (15): 4277-4290.

Chae K., Kieslich C.A., Morikis D., Kim S.-C. y Lord E.M. 2009. A Gain-of-Function Mutation of *Arabidopsis* Lipid Transfer Protein 5 Disturbs Pollen Tube Tip Growth and Fertilization. *Plant Cell.* 21. 3902-3914

Chinnusamy V., Zhu J. y Jian-Kang Z. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci.* 12 (10). 444-451.

Chrousos G.P. y Gold P.W. 1992. The concepts of stress and stress system disorders overview of physical and behavioral homeostasis. *J. Am. Med Dir Assoc.* 267 (9). 1244-1252.

Clark A.M. y Bohnert H. .1999. Cell-specific expression of genes of the lipid transfer proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 40 (1): 69-79.

Cosentino C., Fischer-Schliebs E., Bertl A., Thiel G. y Homman U. 2010. Na⁺/H⁺ antiporters are differentially regulated in response to NaCl stress in leaves and roots of *Mesembryanthemum crystallinum*. *New Phytol.* 186. 669-680

Curtis M.D. y Grossniklaus U. 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* 133. 462-469.

Dani V., Simon W. J., Duranti M. y Croy R. R. 2005. Changes in the tobacco leaf apoplast proteome in response to salt stress. *Proteomics.* 5 (3). 737-745.

Du J., Huang Y.P., Xi J., Cao M.J., Ni W.S., Chen X., Zhu J.K., Oliver D.J. y Xiang C.-B. 2008. Functional gene-mining for salt-tolerance genes with the power of *Arabidopsis*. *Plant J.* 56 (4) 653-664

Eastmond P.J. y Graham I.A. 2001. Re-examining the role of the glyoxylate cycle in oilseeds. *Trends Plant Sci.* 6 (2): 72-78

Eklund D.M. y Edqvist J. 2003. Localization of nonspecific lipid transfer proteins correlated with programmed cell death responses during endosperm degradation in *Euphorbia lagascae*. *Plant Physiol.* 132. 1249-1259

Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D. y Basra S.M.A. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms, and management. *Agron. Sustain. Dev.* 29. 185-212.

Frommer W.B. y Ninnemann O. 1995. Heterologous expression of genes in bacterial, fungal, animal, and plants cells. *Annu. Rev. Plant physiol. Plant Mol. Biol.* 46. 419-444

Gaspar T., Franck T., Bisbis B., Kevers C., Joule L., Hausman J.F. y Dommes J. 2002. Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth regul.* 37. 263-285.

George S. y Parida A. 2010. Characterization of an oxidative stress inducible nonspecific lipid transfer protein coding cDNA and its promoter from drought tolerant plant *Prosopis juliflora*. *Plant Mol. Biol. Rep.* 28. 32-40.

Gómez-Anduro G y Jimenez-Bremont J.F. 2010. La adaptación del nopal (*Opuntia streptacantha*) a ambientes aridos requiere la expresión del gen de una proteína transportadora de lípidos como estrategia fisiologica. Primer Congreso de agricultura y Biosalinidad en Zonas Áridas. Junio 10 y 11. Guerrero Negro, B.C.S.)

Gonorazky A.G., Regente M.C. y de la Canal L. 2005. Stress induction and antimicrobial properties of a lipid transfer protein in germinating sunflower seeds. *J Plant Physiol.* 162 (6): 618-624

Gorjanovic S., Suznjevic D., Beljanski M., Ostojic S., Gorjanovic R., Vrvic M. y Hranisavljevic. 2004. Effects of lipid-transfer protein from malting barley grain on brewers yeast fermentation. *J. Inst. Brew.* 110 (4): 297-302

Gurley W.B. y Key J.L. 1991. Transcriptional of the heat-shock response: a plant perspective. *Biochemistry-US.* 30 (1): 1-12

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

Hincha D.K. 2002. Cryoprotectin: a plant lipid-transfer protein homologue that stabilizes membranes during freezing. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 357. 909-916

Hincha D.K., Neukamm B., Srour H.A.M., Sieg F., Weckwarth W., Rückels M., Lullien-Pellerin V., Schröder W. y Schmitt J.M. 2001. Cabbage cryoprotectin is a member of the nonspecific plant lipid transfer protein gene family. *Plant Physiol.* 125 (2): 835-846.

Hollenbach B., Schreiber L., Hartung W. y Dietz K.-J. 1997. Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly. *Planta.* 203. 9-19.

Huang D., Wu W., Abrams S.R. y Cutler A.J. 2008. The relationships of drought-related gene expression in *Arabidopsis thaliana* to hormonal and environmental factors. *J. Exp. Bot.* 59. 11. 2991-3007

Jensen L.J., Ussery D.W. y Brunak S. 2003. Functionality of system components: conservation of protein function in protein feature space. *Genome Res.* 13 (11): 2444-2449

Jung H.W., Lim C.W. y Hwang B.K. 2006. Isolation and functional analysis of a pepper lipid transfer protein III (*CALTPIII*) gene promoter during signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. *Plant Sci.* 170. 258-266.

Kader J.-C. 1996. Lipid transfer proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47. 627-654.

Kader J.C. 1997. Lipid-transfer proteins: a puzzling family of plants proteins . Trends plant Sci. 2 (2) 66-70

Karlgren S., Pettersson N., Nordlander B., Mathai J.C., Brodsky J.L., Zeidel M.L., Bill R.M. y Hohmann. 2005. Conditional osmotic stress in yeast. J Biol Chem. 280 (8): 7186-7193

Kilian J., Whitehead D., Horak J., Wanke D., Weinl S., Batistic O., D'Angelo C., Bornberg-Bauer E., Kudla J. y Harter K. 2007. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light drought and cols tress responses. Plant J. 50. 347-363

Kore-eda S., Cushman M.A., Akselrod I., Bufford D., Fredrickson M., Clark E. y Cushman J.C. 2004. Transcript profiling of salinity stress responses by large-scale expressed sequence tag analysis in *Mesembryanthemum cristallinum*. Gene. 341. 83-92

Kranner Il., Minibayeva F.V., Beckett R.P. y Seal C.E.. 2010. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. New Phytol. 188. 655-673.

Kreps A.K., Wu Y., Chang H.-S., Zhu T. Wang X. y Harper F. 2002. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic and cold stress. Plant Physiol. 130. 2129-2141.

Kreps J.A., Wu Y., Chang H.-S., Zhu T., Wang X. y Harper J.F. 2002. Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, Osmotic and cold stress. Plant Physiol. 130. 2129-2141

Kubien D.S., Caemmerer S.V., Furbank R.T. y Sage R.F. 2003. C4 photosynthesis at low temperature. A study using transgenic plants with reduced amounts of Rubisco. *Plant Physiol.* 132. 1577-1585.

Lee J.Y., Min K., Cha H., Shin D.H., Hwang K.Y. y Shu S.W. 1998. Rice non-specific lipid transfer protein: the 1.6 Å cristal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. *J. Mol. Biol.* 276. 437-448.

Lilly S.T., Drummond R.S.M., Pearson M.N. y MacDiarmid R.M. 2011. Identification and Validation of Reference Genes for Normalization of Transcripts. *Mol Plant Microbe In.* 24 (2): 294-304

Lin, J. J. 1995. Electrotransformation of *Agrobacterium*. En: Nickoloff, J. A. (ed.) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 47 *Electroporation Protocols for Microorganisms*, Humana Press, Totowa, NJ, pp: 171-178.

Liu D., Zhang X., Cheng Y., Takano T. y Liu S. 2006. rHsp90 gene expression in response to several environmental stress in rice (*Oriza sativa* L). *Plant Physiol Bioch.* 44. 380-386

Liu J. y Zhu J.K. 1998. A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science.* 280. 1943-1945

Macías F.J., Reveles L., Sáenz L.A., Esparza E.L., Bañuelos R. 2004. Patrón electroforético de arn a partir de cladodios de diferentes cultivares de nopal, en G. Esparza, M.A. Salas, J. Mena y R.D. Valdez (eds.), *Memoria del IX Congreso Nacional y VII Congreso Internacional sobre Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal*, Zacatecas.

Mahajan S. y Tuteja N. Cold, salinity and drought. On overview. 2005. Arch. Biochem. Biophys. 444. 139-58

Main G. D., S. Reynolds y J. S. Gartland. 1995. Electroporation Protocols for *Agrobacterium*. En: Gartland K. M. A. y M. R. Davey (eds.) Methods in Molecular Biology Vol. 44 *Agrobacterium* protocols. Humana Press, Totowa, NJ, pp: 405-412.

Mazzucotelli E., Mastrangelo A.M., Crosatti C., Guerra D., Stanca A.M. y Cattivelli L. 2008. Abiotic stress response in plants: When post-transcriptional and post-translational regulations control transcription. Plant Sci. 174 (4): 420-431

Molina A., Diaz I., Indra K.V., Carbonero V.P. y Olmedo F.-G. 1996. Two cold-inducible genes encoding lipid transfer protein LTP4 the barley show differential responses to bacterial pathogens. Mol Gen Genet. 252. 162-168.

Munns R. 2002. Comparative physiology of salt and water stress. Plant cell Environ. 25. 239-250.

Nagarajan, S. and Nagarajan, S. 2010. Abiotic stress adaptation in plants. Physiological, molecular and genomic foundation. En: Abiotic stress adaptation in plants. Physiological, molecular and genomic foundation Pareek, A., Sopory, S. K., Bohnert, H. I, Govindjee (ed). pp. 1-11. Springer, The Netherlands.

Nisbet R.A. y Patten D.T. 1974. Seasonal temperature acclimation of a prickly-pear cactus in south-central Arizona. Oecologia. 15. 345-352.

Ochoa-Alfaro A.E., Rodríguez-Kessler M., Pérez-Morales M.B., Delgado-Sánchez P., Cuevas-Velazquez C.L., Gómez-Anduro G. y Jiménez-Bremont J.F. 2011. Functional characterization of an acidic SK3 dehydrin isolated from an *Opuntia streptacantha*. Planta. DOI 10.1007/s00425-011-1531-8.

Ochoa-Alfaro A.E., Silva-Ortega C.O., Becerra-Flora A., Flores-Rivas J. y Jimenez-Bremont J.F. 2008. Effect of salt stress, Proline and polyamines on seed germination of *Opuntia streptacantha*. *J. PACD*. 56-70.

Pagnussat L.A., Lombardo C., Regente M., Pinedo M., Martín M. y de la Canal L. 2009. Unexpected localization of a lipid transfer protein in germinating sunflowers seeds. *J Plant Physiol*. 166 (8): 797-806

Park C.J., Shin R., Park J.M., Lee G.J., Jou J.S. y Paek K.H. 2002. Induction of a pepper cDNA encoding a lipid transfer protein during the resistance response to tobacco mosaic virus. *Plant Mol. Biol*. 48 (3): 243-254

Qin X., Liu Y., Mao S., Li T., Gu H., Chu C. y Wang Y. 2011. Genetic transformation of lipid transfer protein encoding gene in *Phalaenopsis amabilis* to enhance cold resistance. *Euphytica*. 177. 33-43.

Rebman J.P. y Pinkava D.J. 2001. *Opuntia cacti* of north America-an overview. *Fla Entomol*. 84 (4): 474-483

Reyes-Díaz M., Ulloa N., Zúñiga-Feest A., Gutiérrez A., Gidekel M., Alberdi M., Corcuera L.J. y Bravo L.A.. 2006. *Arabidopsis thaliana* avoids freezing by supercooling. *J. Exp. Bot*. 57 (14): 3687-3696

Rodríguez M., Canales E. y Borrás-Hidalgo O. 2005. Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotechnology Aplicada*. 22. 1-10.

Sambrook J. y Russell D.W. 2001. *Molecular Cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Tercera edición. New York U.S.A. 1.1-18.125

Samuel D., Liu Y.-J., Cheng C.-S. y Lyu P.-C.. 2002. Solution structure of plant non-specific lipid transfer protein-2 from rice (*Oriza sativa*). J. Biol. Chem. 277 (20): 35267-35273.

Schmid M., Davison T.S., Henz S.R., Pape U.J., Demar M., Vingron M., Schölkopf B., Weigel D. y Lohmman J. 2005. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development. Nat Genet. 37 (5): 501-5006

Shaw C. H. 1995. Introduction of Cloning Plasmids into *Agrobacterium tumefaciens*. En: Jones H. (ed.) Methods in Molecular Biology Vol. 49 Plant Gene Transfer and Expresion Protocols. Humana Press, Totowa, NJ, pp: 33-37.

Silos H., Rodríguez E., Rascón Q., Cabrera J.L. y Paredes O. 2002. Transformación genética del fruto por medio del sistema natural de *Agrobacterium tumefaciens*. Cuaderno de Trabajo. Sistema Nacional de Investigación Miguel Hidalgo, Querétaro.

Silos, H., Paredes O., Guevara F. y Castro J.O. 2002. Calidad y proceso de maduración del fruto. Cuaderno de Trabajo. Sistema Nacional de Investigación Miguel Hidalgo, Querétaro.

Silva H., Acevedo E. y Silva P. 2001. Anatomía del tejido fotosintético de diez taxa de *Opuntia* establecidos en el secano árido mediterráneo de Chile. Rev. Chil. Hist Nat. 74. 341-351.

Sohal A.K., Pallas J.A. y Jenkins G.I. 1999. The promoter of a *Brassica napus* lipid transfer protein gene is active in a range of tissues and stimulated by light and viral infection in transgenic *Arabidopsis*. Plant Mol Biol. 41. 75-89.

Steponkus P.L. 1984. Role of the plasma membrane in Freezing injury and cold acclimation. Annu. Rev. Plant Physiol. 35. 543-584.

Sun J.Y., Gaudet D.A., Lu Z.-X., Frick M., Puchalski B. y Laroche A. 2008. Characterization and antifungal properties of wheat nonspecific lipid transfer proteins. *Mol Plant Microbe Interact.* 21 (3): 346-360

Takaiwa F., Oono K., Wing D. y Kato A. 1991. Sequence of three members and expression of a new major subfamily of glutelin genes from rice. *Plant Mol Biol.* 17. 875-885

Thoma S., Kaneko Y. y Somerville C. 1993. A non-specific lipid transfer protein from *Arabidopsis* a cell wall protein. *Plant J.* 3 (3): 427-436

Torres-Schumann S., Godoy J.A. y Pintor-Toro J.A. 1992. A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Mol. Biol.* 18. 794-757.

Treviño M.B. y O'Connell M.A. 1998. Three drought-responsive members of the nonspecific lipid-transfer protein gene family in *Lycopersicon pennellii* show different development patterns of expression. *Plant Physiol.* 116 (4): 1461-1468

Tuteja N. 2007. Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal Behav.* 2 (3): 135-138

Valpuesta V.B.O. y Botella M.A. 2003. Developing salt tolerant plants in a new century: a molecular biology approach. *Plant Cell Tiss Org.* 73. 101-115.

Van der weele C.M., Spollen W.G., Sharp R.E. y Baskin T.I. 2000. Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *J Exp Bot.* 51 (350): 1555-1562

Verslues P.E., Aguarwal M., Katiyar-Aguarwal S., Zhu J. y Zhu J.K. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stress that effect plant water status. *Plant J.* 45. 523-539.

Walley J.W., Coughlan S., Hudson M.E., Covington M.F., Kaspi R., Banu G., Harmer S.L. y Dehesh K. 2007. Mechanical stress biotic and abiotic stress responses via a novel *cis*-element. *PLoS Genet.* 3 (10): e172

Wang C., Xie W., Chi F., Hu W., Mao G., Sun D., Li C. y Sun Y. 2008. BcLTP, a novel lipid transfer protein in *Brassica chinensis*, may secrete and combine extracellular CaM. *Plant Cell Reports.* 27 (1): 159-169.

Wang C., Yang C., Gao C. y wang Y. 2009. Cloning and expression analysis of 14 lipid transfer protein genes from *Tamarix hispida* responding to different abiotic stress. *Tree Physiol.* 29. 1607-1619.

Wang S.Y., Wu J.H., Ng T.B., Ye X.Y. y Rao P.F. 2004. A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. *Peptides.* 25. 1235-1242

Wang W., Vinocur B. y Altman A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta.* 218. 1-4

Weigel D. y Jane G. 2002. How to isolate a gene defined by a mutation. En: Weigel D. y Jane G (ed.). *Arabidopsis a Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, U.S.A.

Wenzel C.L., Hester Q. y Mattsson J. 2008. Identification of genes expressed in vascular tissues Using NPA-induced vascular overgrowth in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 49 (3): 457-468.

Winter D., Vinegar B., Nahal H., Ammar R., Wilson G.V., Provart N.J. 2007. An "Electronic Fluorescent Pictograph" Browser for Exploring and Analyzing Large-Scale Biological Data Sets. *PLoS ONE* 2 (8): e718

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

Xiong L., Schumaker K.S. y Zhu J.-K. 2002. Cell Singnaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell.* S165-S183.

Xu J., Zhang Y., Guan Z., Wei W., Han L., Chai T. 2008. Expression and Fuction of two dehydrins uder environmental stresses in *Brassica juncea* L. *Mol. Breed.* 21. 431-438.

Yadav S.K.. 2010. Cool stress tolerance mechanisms in plants. A Review. *Agron. Sustain. Dev.* 30. 515-527.

Yamaguchi-Shinozaki K. y Shinozaki K. 1993. *Arabidopsis* DNA encoding two desiccation-responsive rd29 genes. *Plant Physiol.* 101. 1119-1120

Yancey P.H., Clark M.E., Hand S.C., Bowlus R.D. y Somero G.N. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science.* 217 (4566): 1214-1222

Yeats T.H. y Rose J.K.C. 2007. The biochemistry and biology extracellular plant lipid transfer proteins (LTPs). *Protein Sci.* 17. 191-198.

Yeats T.H. y Rose J.K.C. 2008. The biochemistry and biology of extracellular plant Lipid Transfer Proteins (LTP's). *Protein Sci.* 17. 191-198.

Yesilirmak F. y Sayers. 2009. Heterologous expression of plant genes. *International Journal of Plant Genomics.* 2009. Special Selection p1

Yu J.-N., Zhang J.-S., Shan L. y Yi Chen S. 2005. Two new group 3 *LEA* genes of wheat and their functional analysis in yeast. *Journal of Integrative plant biology: Formerly. Acta Bot Sin.* 47(11): 1372-1381

Yubero-Serrano E.-M., Moyano E., Medina-Escobar N., Muños-Blanco J. y Caballero J.-L.. 2003. Identification of a strawberry genes encoding a non-specific lipid transfer protein that responds to ABA, woundin and cool stress. *J. Exp. Bot.* 54 (489): 1865-1877.

Zar, J. 1999. *Biostatistical Analysis*, fourth ed. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ, UK. 663 p.

Zhang L., Ma X.-L., Zhang Q., Ma C.-L., Wang P.-P., Sun Y.-F., Zhao Y.-X. y Zhang H.. 2001. Expressed sequence tags from a NaCl-treated *Suaeda salsa* cDNA library. *Gene.* 267. (2): 193-200

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

Zhu J.K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6 (2): 66-71

Zhu J.K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 53. 247-253

10 ANEXOS.

CGTCAAGCAACATCGTACAAGATTGATAAATGTCTCACATGTGTAGTACTTAATAGTCACAATTTGACTA
 CACAAACCTCTACCGACACTAATGTAGCAATTATATCATGTTATATGCTCTTAAGGTATAGTATGTATAA
 CAACATTTTATTCTGTAAAAATATCATCATTTTATATCAAATTTATGATATATAAAAATATCATTATCATTTT
 AAAATAACACTAAAATAATCAGTGCATTTCCGTATAATCTTCATATGAAACTGCAAGAATCCTTGGTGT
 CCAAAGATTATGATGATTATTGTGAGCTTTGATTTATGGTTTCCATCTTGTCAAAAAATGGCTTTTATAA
 ATGGTAGAGCTTTCTTAGTTTTCCCTTAAGATATACACAACAGGTTACAAATATAATTTATTTTTGCTAAA
 AGAAATAGTTATAGTAACTTGTAAAACTACTACAACATTTTTATGGAAAATGTCTTAAAGCTGTTTCA
 ACTTTTATACACATTACTGCATTTACTATTCTGAAATCAATTTTTAATTAAGGTCCTTGTACTATAAGGA
 ATCCTTTAAATAAATATAAATATTAACAATAAAAAAATCCAAAATTTCAGAATGCAATGGTCTTACAATT
 ACAATAAATATGATTTGATTGTACTAAAAATATACCTTAAATACTCACCAATTATCTTTTATAAATATAA
 TCCACAAAATTTCTGGAAGAGGAAAAACAAGTAAATGCAAGTCACATTTACATTTCAAATTACCAACTAC
 CAACTACAACTACTTCCGCGTCTCAAATGAACCACTAATTAATCACTACTTTATATGCTCATCATTTCT
 TTTTCTTTTATTACAATTTCTAGAATAATGACTTAACCAAAATTCATACAAATAAAAAAATTTTTGGCTT
 CCTTACCAGGCTAAGAATTTTGGTATTGAAAATCTAAGTACTTCATAAGAACTGTGGAATCATTAA
 AATTTGTGATCATATATAAAAAAATTTATTCATCTTTATATTTAAGAGTTTAAAACTGCAACTTTTGT
 TTTCTTTTCACTAAGTCTTATGGCCACAGTTAATTAAGAGCAGATGAAAGGTGGTCCAATGGAAAAGAGA
 ATGTGATTGGGCTAGTTGGGAGAGTTCTGATGTCTAGTGTGGGTACACGTGTCCGTCAGTTACACATAG
 CATTAAATCAGACGGCATGTCATTATTCAAATCTAGTTCACATAGTACGACTAATAGCTGATAAATTAAT
 GATTATACAGCATATGAATTATGAATTCAAAAAATAAAAAAATGAAAATGTTAAGGAGATGCTATATT
 TTACAAAATTCATCGCAATGCTTTTCTACTAATTTGCTAAGTGGTCTTCTCCAGTTAGCTTTGTGCGATTCC
 AAGCGATATTATTAATCTTGAAGCATCGCTCAAAGCATATAGCTTAAAGATAACCAAAATGTTATTAAA
 AACACCTAGTGAAATTTTAAATTAACAATAATTTTATGATATCTTTGTAATATCTAATACTACTCTTTCTGT
 GTCTAAAAGGATTAATTTTCAAATTTTCAACATATTAATAAATTTTATTTTCAAATAGTCTTCAAGTTTACA
 ATTCATTTTAGTATTATAATCAACAAAATTTGTATTAAAAAGTTGGAAAATTAATCTTTGTGGAACAAAA
 AAATCTAGAAATCATTTTTGTAGAAATAGAGAGAGGTTTGATAAAAAAATAAAAAAATAGAGAGAGG
 TAGTACATACTAAACGATGTGATACTACTATTGACAAAATCTTAATCTCAGTTTGTAGATAAAGTAG
 AAGGAATGAATGAAGTAAATGCGAATCCAATACTAACAACCCCTACTTAGTCATCATATTTTCCCATAT
 GAAATCCCTATATAAACCCATCATCATCTCCACTTTTTT **CATATCCAAACAACAAAAACATAAGCTAAGA**
 AAACGAACTCAACTAATTTTGTATCACCCAAAAAGAAGTTCAAACACAATGGCTTTTCGCTTTGAGGTT
CTTCACATGCCTTGTTTTAAACGGTGTGCATAGTTGCATCAGTCGATGCTGCAATCTCATGTGGCACAGTG
GCAGGTAGCTTGGCTCCATGTGCAACCTATCTATCAAAGGTGGGTTGGTGCCACCTTCATGTTGTGCAG
GAGTCAAACTTTGAACAGTATGGCTAAAACCACACCAGACCGCAACAAGCTTGCAAGTGCATCCAGTC
CACTGCGAAGAGCATTCTGGTCTCAACCAAGTCTAGCCTCTGGCCTTCTGAAAAGTGCAGTGTAGC
ATTCCATATCCAATCTCCATGAGCACTAACTGCAACAA **GTAAGTATTTAGTTTTGTTTTACTTGATCTAG**
AGACCATGAATTATTTTTCTAATGACAAAATGTGTTCTCTTGATCGTTTGGATTGTTGCAG **CATCAACT**
CA **AATGGAAGCTTACGTCGCTTTTGGCGTTAAGAGTATGGTTTACCAGAAGTACTAGAATAAAAATACG**
GCTATATATCTTAGCTGATATTACCATGTATTTGTTTTGTCTCAATGCTTTGTCTTATTTTCATATCAT
ATGTTGTATTGATGTGCTAAAACATGATAATAGTACCTTATTAGTCATCTTCTTTCTAGATATCTCCTC
CAACGCATACGAACGTAATAAATAATATGTGAAGAGTTTTATAACT

Figura. Anexo A.1. Secuencia de ADN genómico de *A. thaliana*, la secuencia sin sombreado región promotora 2000 pb, rojo UTR 5', amarillo exón, gris intron, verde exón, café UTR 3'

Anexo A.2. Tabla Porcentajes de germinación de la T2

Línea 1	No. De organismos germinados	% de organismos germinados
2	4/10	40%
3	7/10	70%
4	10/10	100%
5	7/10	70%
6	7/10	70%
7	6/10	60%
8	7/10	70%
Línea 2	No. De organismos germinados	% de organismos germinados
1	7/10	70%
2	9/10	90%
3	9/10	90%
4	7/10	70%
5	6/10	60%
6	2/10	20%
7	7/10	70%
8	5/10	50%
9	5/10	50%
Línea 3	No. De organismos germinados	% de organismos germinados
1	6/10	60%
2	6/10	60%
4	9/10	90%
5	10/10	100%
6	7/10	70%
7	8/10	80%
8	9/10	90%

Anexo A.3.

```

PCRN011LTPFW -----
PCRN012LTPFW -----
CTLTPRV -----
LTP -----
PCRN011LTPRV -----CTAGCTCAGCGGTTGTTAAAGTTA
PCRN012LTPRV -----CTAGCTCAGCGGTTGTTAAAGTTA
CTLTPRV -----CTAGCTCAGCGGTTGTTAAAGTTA

PCRN011LTPFW -----GCTGTTTTCCATGCTTGGTTGTTGCTGCACCCATGCAGAAGCGGCCATAACC
PCRN012LTPFW -----CGCTGTTTTCCATGCTTGGTTGTTGCTGCACCCATGCAGAAGCGGCCATAACC
CTL -----CTGCGCTGTTTTTC-TATGCATGGTTGTTGCTGCACCCATGCAGAAGCGGCCATGACC
LTP -----GCTTGCCTGTTTTCCATGCATGGTTGTTGCTGCACCCATGCAGAAGCGGCCATAACC
PCRN011LTPRV -----GCTTGCCTGTTTTCCATGCTTGGTTGTTGCTGCACCCATGCAGAAGCGGCCATAACC
PCRN012LTPRV -----GCTTGCCTGTTTTCCATGCTTGGTTGTTGCTGCACCCATGCAGAAGCGGCCATAACC
CTLTPRV -----GCTTGCCTGTTTTCCATGCATGGTTGTTGCTGCACCCATGCAGAAGCGGCCATGACC
*****

PCRN011LTPFW TGTGGCGCAGTGGCACAGAACCTCGGCCCATGCATAACGTTCTTGAAGACTGGGGGTGCA
PCRN012LTPFW TGTGGCGCAGTGGCACAGAACCTCGGCCCATGCATAACGTTCTTGAAGACTGGNGGTGCA
CTL TGTGGCGCAGTGGCACAGAACCTCGGCCCATGCATAACGTTCTTGAAGACTGGGGGTGCA
LTP TGTGGCGCAGTGGCACAGAACCTCGGCCCATGCATAACGTTCTTGAAGACTGGGGGTGCA
PCRN011LTPRV TGTGGCGCAGTGGCACAGAACCTCGGCCCATGCATAACGTTCTTGAAGACTGGGGGTGCA
PCRN012LTPRV TGTGGCGCAGTGGCACAGAACCTCGGCCCATGCATAACGTTCTTGAAGACTGGGGGTGCA
CTLTPRV TGTGGCGCAGTGGCACAGAACCTCGGCCCATGCATAACGTTCTTGAAGACTGGGGGTGCA
*****

PCRN011LTPFW CCATCAGCTGCCTGTTGCGCCGGGGTTAGGAAGCTTGTGAGCATGGCTACCACCTCGGCC
PCRN012LTPFW CCATCAGCTGCCTGTTGCGCCGGGGTTAGGAAGCTTGTGAGCATGGCTACCACCTCGGCC
CTL CCATCAGCTGCCTGTTGCGCCGGGGTTAAGAAGCTTGTGAGCATGGCTACCACCTCGGCC
LTP CCATCAGCTGCCTGTTGCGCCGGGGTTAAGAAGCTTGTGAGCATGGCTACCACCTCGGCC
PCRN011LTPRV CCATCAGCTGCCTGTTGCGCCGGGGTTAGGAAGCTTGTGAGCATGGCTACCACCTCGGCC
PCRN012LTPRV CCATCAGCTGCCTGTTGCGCCGGGGTTAGGAAGCTTGTGAGCATGGCTACCACCTCGGCC
CTLTPRV CCATCAGCTGCCTGTTGCGCCGGGGTTAAGAAGCTTGTGAGCATGGCTACCACCTCGGCC
*****

PCRN011LTPFW GATCGGAAAAC TGCTTGTGGGTGCCTCAAACAAACTGCTGCTACTATTCCAGGTCTTAAAC
PCRN012LTPFW GATCGGAAAAC TGCTTGTGGGTGCCTCAAACAAACTGCTGCTACTATTCCAGGTCTTAAAC
CTL GATCGGAAAAC TGCTTGTGGGTGCCTCAAACAAACTGCTGCTACTATTCCAGGTCTTAAAC
LTP GATCGGAAAAC TGCTTGTGGGTGCCTCAAACAAACTGCTGGTACTATTCCAGGTCTTAAAC
PCRN011LTPRV GATCGGAAAAC TGCTTGTGGGTGCCTCAAACAAACTGCTGCTACTATTCCAGGTCTTAAAC
PCRN012LTPRV GATCGGAAAAC TGCTTGTGGGTGCCTCAAACAAACTGCTGCTACTATTCCAGGTCTTAAAC
CTLTPRV GATCGGAAAAC TGCTTGTGGGTGCCTCAAACAAACTGCTGCTACTATTCCAGGTCTTAAAC
*****

PCRN011LTPFW TGCGGGAATGCTGCTGCTGCTGCTGGCAAATGTGGCACTAGTGTGCCTTACCCATTAGC
PCRN012LTPFW TGCGGGAATGCTGCTGCTGCTGCTGGCAAATGTGGCACTAGTGTGCCTTACCCATTAGC
CTL TACGGGAATGCTGCTGCTGCTGCTGGCAAATGTGGCACTAGCGTGCCTTACCCATTAGC
LTP TACGGGAATGCTGCTGCTGCTGCTGGCAAATGTGGCACTAGTGTGCCTTACCCATTAGC
PCRN011LTPRV TGCGGGAATGCTGCTGCTGCTGCTGGCAAATGTGGCACTAGTGTNCCT-ACCCCAT----
PCRN012LTPRV TGCGGGAATGCTGCTGCTGCTGCTGGCAAATGTGGCACTAGTGTNCCT-ACCCCATAG--
CTLTPRV TACGGGAATGCTGCTGCTGCTGCTGGCAAATGTGGCACTAGCGTGCCT-ACCCCATAG--
* * * * *

PCRN011LTPFW CCTAACCCGACTGCTCCAAGGTGA-----
PCRN012LTPFW CCTAACCCGACTGCTCCAAGGTGA-----
CTL CCTAACCCGACTGCTCCAAGGT-----
LTP CCTAACCCGACTGCTCCAAGGTGAAGTAGATGGATCGGATGACTATATGACAAGGGAGA
PCRN011LTPRV -----
PCRN012LTPRV -----
CTLTPRV -----

```

Anexo A.3. Alineamiento múltiple la secuencia de *OpsLTP1*, con secuencias de productos de PCR amplificado con los primer *OpsLTP1* forward y *OpsLTP1* reverse a partir de ADNc de plantas de *A. thaliana* Over-*OpsLTP1*.