



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Análisis proteómico de la hoja de amaranto bajo
condiciones de estrés salino**

Tesis que presenta

Christian Salvador Mendoza Hernández

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

San Luis Potosí, S.L.P. 2011



Constancia de aprobación de la tesis

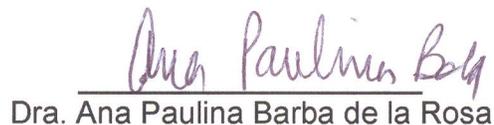
La tesis “**Análisis proteómico de la hoja de amaranto bajo condiciones de estrés salino**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Christian Salvador Mendoza Hernández** y aprobada el **06 de Julio de 2011** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.



Dra. Lina Raquel Riego Ruíz



Dr. J. Sergio Casas Flores



Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección de la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (332625) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este trabajo fue apoyado por el proyecto Amaranth: Future-Food.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 079 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 6 días del mes de julio del año 2011, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Lina Raquel Riego Ruiz	Presidenta	IPICYT
Dr. J. Sergio Casas Flores	Secretario	IPICYT
Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Christian Salvador Mendoza Hernández

sobre la Tesis intitulada:

Análisis proteómico de la hoja de amaranto bajo condiciones de estrés salino.

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 13:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición del interesado y para los fines que al mismo convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 6 días del mes de julio de 2011.


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



Dedicatorias

A mis padres por apoyarme en todos los proyectos de mi vida

A mis hermanos por estar a mi lado en todo momento

A mi novia por apoyarme en toda la maestría y por ser una parte importante de
esta tesis

A toda mi familia, a mis abuelitos, mis tíos, primos, sobrinos.

A la familia Mancera

Agradecimientos

A la Dra. Ana Paulina Barba de la Rosa

Al Dr. Antonio De León Rodríguez

A mis sinodales

Al M. en C. Ángel Huerta Campo

Al M. en C. Alberto Barrera Pacheco

A mis compañeros del Laboratorio de Proteómica y Biomedicina Molecular

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica A.C.

A la señora Sonia Patiño

Índice General

	Pág
Índice General	vii
Índice de Tablas	viii
Índice de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	x
Resumen	xii
Abstract	xiii
I. Introducción	1
II. Materiales y métodos	4
2.1 Material vegetal y tratamiento salino	4
2.2 Determinación de las concentraciones de prolina y azúcares totales en hojas de amaranto	4
2.3 Extracción de proteínas totales de hojas de amaranto	5
2.4 Electroforesis en doble dimensión (2-DE) de las proteínas de hojas de amaranto	6
2.5 Adquisición y análisis de imágenes de los geles 2-DE	6
2.6 Espectrometría de masas de las manchas de proteínas	7
III. Resultados y discusión	8
3.1 Respuesta de las plantas de <i>Amaranthus cruentus</i> al estrés salino	8
3.2 Contenido de prolina y azúcares solubles totales en hojas de amaranto	10
3.3 Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente	12
IV Conclusiones	20
V Referencias	21
Anexos	27

Índice de Tablas

	Pág
Tabla 1. Composición de aminoácidos esenciales en harina, de diferentes variedades de amaranto	3
Tabla 2. Proteínas identificadas y su cambio relativo en hoja de amaranto sometidas a 150 mM de NaCl	15
Tabla Suplementaria 1. Manchas diferenciales con respecto al control o entre las muestras analizadas por espectrometría de masas en tándem	29

Índice de Figuras

	Pág
Figura 1. Cultivo de <i>Amaranthus cruentus</i> en hidroponía.	9
Figura 2. Determinación de prolina y azúcares totales en hoja de <i>A. cruentus</i> de la muestra control y de las muestras sometidas a estrés salino.	11
Figura 3. Perfil en 2-DE de las proteínas de hojas de <i>Amaranthus cruentus</i> .	13
Figura 4. Abundancia relativa de las manchas diferenciales.	14
Figura Suplementaria 1. Patrones en una dimensión de las muestras de hoja de amaranto.	27
Figura Suplementaria 2. Patrones bidimensionales de proteínas de hoja de amaranto, teñidos con Coomassie Coloidal (Brillant Blue G250).	28

Lista de Abreviaturas

µL	microlitros
µm	micrómetros
2-DE	Electroforesis en doble dimensión
2-ME	2-Mercaptoetanol
ACN	Acetonitrilo
Ammbic	Bicarbonato de amonio
APX	Ascorbato peroxidasa
BSA	Albúmina sérica bovina
CHAPS	3-[(3-Choloamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfanato
Con	Control
d	Días
Da	Daltons
dS/m	deciSiemens por metro
DTT	Ditiotreitol
g	Gramos
h	hora(s)
IPG	Gradiente inmovilizado de pH
M	Molar
m/z	masa/carga
mg	miligramos
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
mm	milímetros
NDPK	Nucleótido difosfato cinasa
nL	nano litros
nm	nanómetros
° C	grados Centígrados
p/v	Relación peso/volumen
PM	Peso molecular
PSA	Persulfato de amonio
PVPP	Polivinil-polipirrolidona
ROS	Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TCA	Ácido tricloroacético

TEMED	N,N,N',N'-Tetrametilendiamina
TOF	Tiempo de vuelo (Time of Flight)
Tris	Hidroximetil-aminometano
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
v/v	Relación volumen/volumen
vol	Volumen(es)

RESUMEN

Análisis proteómico de la hoja de amaranto bajo condiciones de estrés salino

Una vasta superficie mundial de los suelos agrícolas se encuentra afectada por exceso de iones sodio, convirtiéndose en uno de los principales factores que limitan la productividad agrícola. El estudio de los mecanismos de respuesta al estrés en plantas mediante un enfoque proteómico puede contribuir a identificar genes y rutas metabólicas que son cruciales para la tolerancia y la respuesta a diferentes tipos de estrés. Mediante la electroforesis bidimensional (2-DE) se pueden evaluar los cambios de proteínas que pudieran estar involucradas con la señalización en respuesta al estrés salino. El amaranto además de producir semillas de alta calidad nutritiva y nutracéutica, es una planta que naturalmente es resistente a estrés abiótico. En el presente trabajo se evaluó la expresión diferencial de proteínas en hoja de *Amaranthus cruentus* sometido a estrés salino (150 mM de NaCl), en comparación con la condición control (sin estrés) y entre los tratamientos. La acumulación de prolina y azúcares totales, así como los cambios del perfil de proteínas fueron evaluados a 1 h, 10 h, 24 h y 7 d después de la exposición al estrés. Las proteínas diferenciales fueron identificadas mediante nano-LC/ESI-MS/MS. Se detectaron 290 manchas con tinción de Coomassie Coloidal, de los cuales 34 mostraron cambios diferenciales durante la exposición al estrés.

Palabras clave: Estrés salino, *Amaranthus cruentus*, LC/ESI-MS/MS, prolina, azúcares solubles.

ABSTRACT

Proteomic analysis of amaranth leaves under salt stress

A vast area of agriculture land is affected by excess of sodium ions, becoming in one of the primary factors that restrict agricultural productivity. Amaranth can be growing as alternating cereal, because it produces nutritional and nutraceutical seeds. The comprehension of the mechanism of stress responses in plants using proteomic approach can contribute to identify crucial genes and metabolic pathways involved in the tolerance and response to different stress. Through two-dimensional (2 D) electrophoresis we can evaluate changes in proteins involved in salt stress signaling. In this work, we evaluated the differential expression of *Amaranthus cruentus* leaf proteins under salt stress (NaCl 150 mM), compared with control (NaCl 0 mM) and between treatments. The changes in the profile of proteins were evaluated at 1h, 10h, 24h and 7 d of stress exposition. Differential proteins were identified through nano-LC/ESI-MS/MS. 290 spots were identified with Coomassie staining, 34 spots show differential changes to stress exposure.

Key words: Salt stress, *Amaranthus cruentus*, LC/ESI-MS/MS, proline, soluble sugars.

1. Introducción

El estrés salino es el principal estrés abiótico que afecta el rendimiento en la producción y la calidad de diferentes cultivos (Pang y col, 2010). Aproximadamente el 10% (954 millones de hectáreas) de las tierras de cultivo, están afectadas por la salinidad de forma natural o debido a procesos inducidos por el ser humano (Pessarakli y Szabolcs, 1999). Se estima que para el 2050, el estrés salino afectará la mitad de toda la tierra cultivable y será el principal factor de la pérdida de los cultivos en las siguientes décadas (Wang y col, 2003).

En general, las altas concentraciones o incrementos de las sales en los suelos, provoca en las plantas la desregulación iónica, el estrés hiperosmótico, el estrés oxidativo, la alteración en el metabolismo y la reducción en la asimilación de CO₂ (Zhu, 2002; Bohnert y Jensen, 1996; Reddy y Peng, 2006). Para sobrevivir al estrés, las plantas responden por medio de mecanismos complejos que incluyen estrategias de desarrollo, respuestas morfológicas, bioquímicas y fisiológicas a nivel molecular y celular (Hasegawa y col, 2000; Zhu, 2002; Taji y col, 2004; Parida y Das, 2004).

Sin embargo, no todas las plantas responden de manera similar al estrés salino por lo que se han clasificado en halófitas y glicofíticas. Las plantas halófitas crecen en concentraciones de 400 mM de NaCl (Edward y col, 1999; Tester y Davenport, 2003). Las plantas glicofíticas, consideradas como tolerantes a la salinidad, son aquellas que pueden desarrollarse en 50 mM de NaCl (Cerezo, 1998).

Cuando altas concentraciones de NaCl entran a la planta, y esta no cuenta con la habilidad adecuada de excluir o compartimentalizar los iones en la vacuola, los iones Na⁺ y Cl⁻ en la hoja podrían eventualmente alcanzar niveles riesgosos de toxicidad, causando senescencia, lesiones y reducción del área fotosintética a niveles que no se podrá sustentar el crecimiento (Munns, 2002). Para restaurar la presión osmótica y evitar el daño a las proteínas las plantas sintetizan y acumulan osmolitos biocompatibles (Hasegawa y col, 2000). La prolina es uno de los osmolitos más estudiados, se ha reportado que se acumula bajo diferentes condiciones de estrés abiótico en diferentes especies (Delauney y Verma, 1993).

El estrés salino produciendo cambios diferenciales en la expresión de algunos genes y proteínas (Kong-Ngern y col, 2005; Parker y col, 2006). Dentro de las principales proteínas que son reguladas diferencialmente por el estrés salino, se encuentran aquéllas que están involucradas en la fotosíntesis, fotorespiración, estrés oxidativo, síntesis de proteínas, proteínas del tipo choque térmico, proteínas relacionadas a la síntesis de aminoácidos y de unión a calcio (Abbasi y Komatsu, 2004; Kim y col, 2005).

La salinidad en los suelos se hace cada vez más severa, por lo cual Glenn y Brown (1999) ha propuesto el cultivo de plantas halófitas, las cuales podrán proveer una fuente alimentaria para muchos países en desarrollo como México. Para considerar a un suelo como salino, los valores de conductividad eléctrica deben ser mayores a 4.0 dS/m, equivalentes a 40 mM de NaCl (Munns, 2008).

La proteómica es una tecnología de vanguardia con la cual se pueden detectar cambios diferenciales en las proteínas, estudiar las funciones biológicas de las plantas y analizar la expresión global de las proteínas en un tejido (Kim y col, 2005; Xu y Huang, 2010). Una herramienta ampliamente utilizada en los estudios proteómicos es la electroforesis en geles de poliacrilamida en dos dimensiones (2-DE), la cual permanece como el método de separación de proteínas más utilizado (Jellouli y col, 2008). Los geles en 2-DE se han empleado para el escrutinio de las proteínas en diferentes especies de plantas, sometidas a un amplio rango de tratamientos abióticos, incluyendo el salino (Abbasi y Lomatsu, 2004; Shau y Shaw, 2009). La mayor cantidad de estos estudios proteómicos se han realizado en torno a plantas modelos como *Arabidopsis thaliana* y halófitas como *Thellungiella halophila*, las cuales no representan cultivos alimentarios, por lo que es de especial interés buscar nuevos modelos de plantas con potencial alimentario que posean resistencia natural al estrés abiótico.

El amaranto es considerado como un grano con alto potencial de explotación comercial (Sánchez, 2007). La planta de amaranto es resistente a estrés por sequía (Huerta-Ocampo y col 2010), crece en diferentes ambientes y muestra excelentes características agronómicas (Barba de la Rosa y col, 2009). Las hojas de amaranto contienen altas concentraciones de proteína (28% al 49%), aceite insaturado (45 % de ácido linoleico), fibra (11 % al 23 %) y minerales como el potasio, hierro, magnesio y calcio (Schnetzler y Breen, 1994). Es una buena fuente de semillas con un alto valor nutritivo, las cuales tienen grandes cantidades de proteínas (17%) y la composición de los aminoácidos es cercana a la concentración óptima de aminoácidos requeridos por la dieta humana (tabla 1), es rica en lisina, triptófano y metionina, lo que hace al grano de amaranto un excelente complemento para los cereales (Schnetzler y Breen, 1994; Barba de la Rosa, 2009). Además de sus componentes nutricionales, las semillas de amaranto contienen otras sustancias que se encuentran involucradas en diferentes funciones biológicas tales como inhibidores de proteasas, péptidos antimicrobianos, lectinas y compuestos antioxidantes (Valdés y col, 1993). Se han identificado péptidos bioactivos que forman parte en las proteínas de reserva de amaranto, los cuales poseen diversas actividades biológicas, se encuentran inmiscuidos en la

Tabla 1.- Composición de aminoácidos esenciales en harina, de diferentes variedades de amaranto. (g de amino ácidos 100g⁻¹ de proteína cruda) ^a

Aminoácido	Tulyehualco	DGETA	Gabriela	Nutrisol	FAO/WHO/UNU (1986)
Ile	3.2	2.2	3.1	3.5	1.3
Leu	5.8	5.0	6.5	6.6	1.9
Lys	6.9	5.2	7.5	6.7	1.6
Met + Cys ^b	0.3	1.7	6.5	7.2	1.7
Phe + Tyr ^c	7.9	3.7	8.3	7.3	1.9
Thr	3.8	3.3	4.8	4.6	0.9
Val	3.4	2.6	3.6	3.9	1.3

^a Tomado de Barba de la Rosa y col (2009).

^b Requerimientos de metionina + cisteína.

^c Requerimientos de fenilalanina + tirosina.

anticarcinogénesis y en la actividad antihipertensiva (Silva y col, 2008; Maldonado-Cervantes, 2010; Barba de la Rosa y col 2010).

El entendimiento de los mecanismos moleculares involucrados en la tolerancia natural a la salinidad en plantas podría generar información para desarrollar cultivos de mayor valor comercial tolerantes a diferentes grados de estrés salino (Pang y col, 2010). A la fecha, no existen estudios proteómicos en hojas de amaranto relacionados con la respuesta al estrés abiótico, por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue analizar, mediante un enfoque proteómico, la respuesta en hojas de *Amaranthus cruentus* al estrés salino.

2. Materiales y métodos

2.1 Material vegetal y tratamiento salino

Las semillas de *Amaranthus cruentus* (L.) se obtuvieron del germoplasma del INIFAP (Centro experimental bajío, Celaya, México), se germinaron en tierra (Premier, Peat Moss de Sphaigene, Québec, Canada) durante 2 semanas hasta que aparecieron 2 hojas verdaderas. Posteriormente las plantas se transplantaron y se crecieron en hidroponía con solución nutritiva (Hydro Environment, Tlanepantla, Edo. de México, México) durante un lapso de 2 semanas en el invernadero. Se formaron 5 grupos de plantas, cada uno con una n=10, a los cuales se les dio un tratamiento con 150 mM de cloruro de sodio (Fermont, Monterrey, Nuevo León, México). Para la extracción de proteínas totales, el análisis de prolina y azúcares totales, se tomaron muestras de hojas de las plantas control (sin tratamiento) y a 1 h, 10 h, 24 h y 7 d después del tratamiento (la determinación de prolina y azúcares totales no se llevo a cabo a las 10 h). El material fue congelado con nitrógeno líquido, seguido de una molienda (Braun, Naucalpan de Juárez, México). El material finamente molido fue mantenido a -80 °C hasta su uso.

2.2 Determinación de las concentraciones de prolina y azúcares totales en hojas de amaranto

La determinación de la concentración de prolina se realizó de acuerdo a Magne y Larher (1992). Las muestras de hoja se secaron en una estufa (Binder, Tuttlingen, Alemania) a 70 °C durante un periodo de 24 h, el material se pulverizó, de el cual se pesaron 0.5 g de cada una de las muestras. Se añadieron 2 mL de agua milli-Q y se hirvieron durante 15 min. Una alícuota de 0.5 mL del extracto se transfirió a un tubo nuevo añadiendo 0.5 mL de 0.2 M de citrato de sodio, pH 4.6 y 2 mL de reactivo de Ninhidrina al 1 % (en solución ácido acético-agua, 60:40). Las muestras se hirvieron durante 1 h en baño de agua, se enfriaron a temperatura ambiente y se agregaron 2 mL de tolueno.

La concentración de prolina se calculó en base en la absorción a 520 nm, utilizando tolueno como blanco y L-prolina comercial como estándar (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

La concentración de azúcares solubles totales se determinan siguiendo el método reportado por Aghaei y col (2008). Se pesaron 200 mg de material vegetal seco y se maceraron con 5 mL de etanol; la suspensión se sonicó y se centrifugó. La fracción insoluble se lavó con 70 % (v/v) de etanol, se sonicaron y se centrifugaron por segunda vez. La fracción soluble se centrifugó a 3500 rpm durante 3 min. El sobrenadante se recolectó y se adicionaron 3 mL de antrona (150 mg de antrona más 100 mL de H₂SO₄ al 72 %) por cada 0.1 mL del sobrenadante obtenido. La mezcla se colocó en un baño de agua durante 10 min y la reacción se detuvo en hielo. La concentración de azúcares solubles totales se calculó midiendo la absorbancia de las muestras a 625 nm y empleando D-glucosa comercial (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) como estándar. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

2.3 Extracción de proteínas totales de hojas de amaranto

La extracción de proteínas totales de hoja de amaranto, se realizó mediante el método reportado por Huerta-Ocampo (2010) con algunas modificaciones, basado en la precipitación con ácido tricloroacético y acetona (TCA-A). Las muestras de hoja de amaranto se congelaron en nitrógeno líquido y se molieron utilizando un equipo molino para café (Naucalpan de Juárez, México). Se pesaron 3.5 g de cada una de las muestras y se añadieron 3 vol (1 mL por cada gramo) de acetona fría con 10% de TCA, 1% de polivinilpolipirrolidona (PVPP) y 2% de 2 β-Mercaptoetanol. Se agitaron durante 3 min en un vortex y posteriormente se incubaron en hielo durante otros 3 min, se sonicaron (GE-505, Ultrasonic Procesor) a una amplitud de 34 % con un programa de 7 s de pulso por 3 s sin pulso durante 3 min. Las muestras se centrifugaron a 5,000 rpm durante 5 min a 4 °C en una centrifuga Sorval T21 (Sorvall, Kendro Laboratoy Products, Newton, CT, USA). El sobrenadante se filtró con una tela (Magitel, México D.F, México) y se dejó precipitando durante toda la noche a -20 °C. Posterior a la precipitación las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min a 4°C para obtener una pastilla, la cual se lavó con metanol y acetona fría varias veces para eliminar impurezas, se secó a temperatura ambiente hasta eliminar el exceso de acetona y se almacenó a -80 °C. Las pastillas obtenidas se resuspendieron en solución de rehidratación (8 M de Urea, CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfo-nate) y 0.56 % (w/v) de DTT (Ditiotreitol). La concentración de las proteínas totales se determinó empleando la solución de Protein Assay (Bio-Rad, Hércules, CA,

USA), en microplaca utilizando BSA como estándar. La extracción de proteínas totales se realizó por triplicado para cada uno de los tratamientos.

2. 4 Electroforesis en doble dimensión (2-DE) de las proteínas de hojas de amaranto

Para la separación en la primera dimensión por isoelectroenfoque se utilizaron tiras de gradiente inmovilizado de pH (4 a 7) de 13 cm (ImmobilineTM DrySrip, GE Healthcare, Uppsala, Suecia). Las tiras fueron rehidratadas con 250 μ L de cada una de las muestras obtenida en la extracción de proteínas totales, 0.5% de anfólitos acarreadores pH 4-7 y 0.02% de azul de bromofenol durante 16 h a temperatura ambiente. El isoelectroenfoque se llevó a cabo a 20 °C bajo las siguientes condiciones de corrida: (1) Gradiente a 250 volts durante 60 min, (2) Gradiente a 500 volts hasta 0.01 kV/h, (3) Gradiente a 4 000 volts hasta 3.4 kV/h y (4) Paso y retención a 8 000 volts hasta 14.1 kV/h. Una vez realizado el isoelectroenfoque las tiras se almacenaron a -20 °C. Posteriormente las tiras se equilibraron con 1 % (w/v) de DTT y redujeron con 2.5 % (w/v) de iodoacetamida en solución de equilibrio (50 mM de Tris pH 8.8, 6 mM de Urea, 30 % de Glicerol, 2% de SDS y 0.002 % de Azul de bromofenol) durante un periodo de 15 min. Las tiras equilibradas se transfirieron a geles de poliacrilamida al 13 %. La separación se llevó a cabo en el sistema HoefferTM SE600 RubyTM (GE Healthcare). Los geles por triplicado se tiñeron con 66 % de Coomassie Coloidal, Brilliant Blue G-250 (USB, Germany).

2.5 Adquisición y análisis de imágenes de los geles 2 DE

Las imágenes de los geles 2 DE se adquirieron mediante el Sistema PharosFXTM Plus (Bio-Rad) y se analizaron mediante el programa Melanie v.7.0 2D Gel Análisis (GenBio, Geneva, Suiza). La detección de las manchas de proteínas se realizó substrayendo el fondo e identificando las manchas en cada uno de los geles 2 DE. A fin de corregir la variabilidad y reflejar las variaciones cuantitativas, el volumen de las manchas se normalizó como porcentaje del volumen total en todas las manchas en el gel. El peso molecular aparente se determinó con base en la posición de las manchas con respecto al marcador de peso molecular (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) y se determinó el punto isoeléctrico de cada mancha con respecto a la migración de éstos en las tiras de gradiente de pH inmovilizado (pH 4-7 lineal). Los datos obtenidos se analizaron en el programa Statistica 7.0TM usando la prueba “t” para muestras independientes, con una $p \leq 0.05$.

2.6 Espectrometría de masas de las manchas de proteínas

Las manchas seleccionados se cortaron cuidadosamente de los geles 2-DE. Se lavaron con 50 μL de 25 mM de NH_4HCO_3 (AmmBic) (pH 7.8), 25 μL de 25 mM de acetonitrilo (ACN)/AmmBic (1:1 [v/v]) y con ACN puro, con el fin de remover los posibles contaminantes. Los fragmentos de gel se secaron al vacío en un evaporador (Eppendorf, Hamburg, Alemania). Las muestras se redujeron con 10 mM de DTT en 25 mM de AmmBic y se alquilaron con 55 mM de iodoacetamida. La digestión se llevó a cabo durante toda la noche a 37 °C con tripsina porcina (Promega, Madison, WI, USA). Los fragmentos resultantes se lavaron con una solución de ACN/agua (3:2 [v/v]) y 0.1 % de ácido trifluoroacético y se concentraron a un volumen final de aproximadamente 10 μL . Los péptidos fueron desalados empleando columnas con Zip-Tip C18 (Millipore, Billerica, MA, USA). Los péptidos fueron separados por nano Cromatografía de Líquidos de Ultra Presión nano-UPLC (Waters, Milford, MA, USA), equipado con una pre-columna C18 (5 μm , 20 mm x 180 μm , Waters) y con una columna analítica BEH130 C18 (1.7 μm , 100 mm x 100 μm , Waters). Por cada muestra digerida, se inyectaron 4 μL , con una solución al 0.1 % de ácido fórmico a un flujo de 600 nL/min. Después de la desalación y pre-concentración, los péptidos se eluyeron de la columna analítica y se separaron con un gradiente lineal del 3-80 % de la fase móvil B (0.1 % de ácido fórmico en ACN) durante 30 min a un flujo de 600 nL/min, seguido de 3 lavados con 85 % de la fase móvil B por 2 min. La columna se equilibró con la fase móvil A (0.1 % de ácido fórmico). El análisis de espectrometría de masas de los fragmentos digeridos se realizó en el espectrómetro de masas SYNAPT-HDMS (Waters). El espectrómetro de masas se operó en modo V y en modo positivo (ESI). Para obtener los tamaños de los péptidos, el TOF fue calibrado externamente con [Glu1]-fibrinopéptido B (Sigma), m/z 133 a 2422. Los datos independientes de masas (LC-MS) se recolectaron en un modo de adquisición MS^e .

La interpretación de los datos $m/z+$ del MS/MS se llevó a cabo empleando, el servidor MASCOT v2.2 (Matrix Science, London, UK; <http://www.matrixscience.com/>). La búsqueda se realizó contra la base de datos no redundante del NCBI nr (National Center for Biotechnology Information non-redundant database) y el subreino *Viridiplantae*, tomando en cuenta las siguientes posibles modificaciones: Carboxiamidometilación de las cisteínas y la oxidación de metioninas. Se utilizó a la tripsina como proteasa, con la pérdida de un corte, una tolerancia de 0.5 Da para el precursor y 0.3 Da para el fragmento de masas.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Respuesta de las plantas de *Amaranthus cruentus* al estrés salino

Se midió la conductividad eléctrica de la solución nutritiva así como la de la solución más 150 mM de NaCl, con la finalidad de compararlas con los límites considerados para un suelo salino (4.0 dS/m, 40 mM de NaCl). Obteniendo que la conductividad eléctrica de la solución nutritiva fué de 3.4 dS/m y de la solución nutritiva más 150 mM de NaCl de 16.125 dS/m respectivamente. Una conductividad eléctrica entre 2.0 y 4 dS/m afecta el rendimiento de cultivos sensibles y en una conductividad eléctrica mayor a 16 dS/m ningún cultivo agrícola crece rentablemente (Kazakidou y Burrage, 1994).

Las plantas de amaranto que se trataron solamente con la solución nutritiva (Control) mantuvieron su vigor y no mostraron cambios en la turgencia de las hojas y tallos durante el tratamiento (Figura 1A). En cambio las plantas tratadas con la solución salina, a la primera hora mostraron la pérdida de la turgencia y de la homeostasis celular (Figura 1B), la cual comenzaron a recuperar mostrando una mayor rigidez en el tallo y en las hojas a las 10 h de tratamiento (Figura 1C). La homeostasis celular se recuperó por completo a las 24 h (Figura 1D), mostrando un turgor en las hojas y tallos iguales a las mostradas por las plantas tratadas solamente con solución nutritiva. La turgencia de las plantas fue mantenida hasta el día 7 (Figura 1E). Una alta osmolaridad origina la pérdida de turgor, conduce a la pérdida de agua del citoplasma, incrementando la distancia entre la membrana plasmática y la pared celular (Bartels y Sunkar, 2005). Los cambios conformacionales inducidos por la pérdida de turgor, actúan como sensores a la pérdida de la presión osmótica, activando cascadas de señalización (Xiong y Zhu, 2002). La respuesta celular a la reducción de la turgencia es el ajuste osmótico (Yokoi y col, 2002). El estrés osmótico interfiere con el volumen de las células y con la homeostasis intracelular, la mayoría de las células expuestas a un medio hiperosmótico disminuyen su tamaño (Kultz y Burg, 1998). El mantenimiento de la homeostasis iónica es crítica para que las plantas combatan el estrés salino (Xiong y Zhu, 2002).

El crecimiento de *Amaranthus cruentus* a diferentes concentraciones de NaCl (0 mM, 50 mM, 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM y 400 mM), se siguió hasta terminar su ciclo de vida (datos del laboratorio, no mostrados en esta tesis). A niveles de 150 mM la planta cumplió su ciclo de vida pero mostro características desfavorables en su desarrollo. A una concentración de 100 mM de NaCl, cumplió su ciclo de vida y se observó un crecimiento menor que la planta control. Mientras que las plantas sometidas a una concentración de 50 mM de NaCl cumplió con su ciclo de vida sin ningún problema, mostrando un

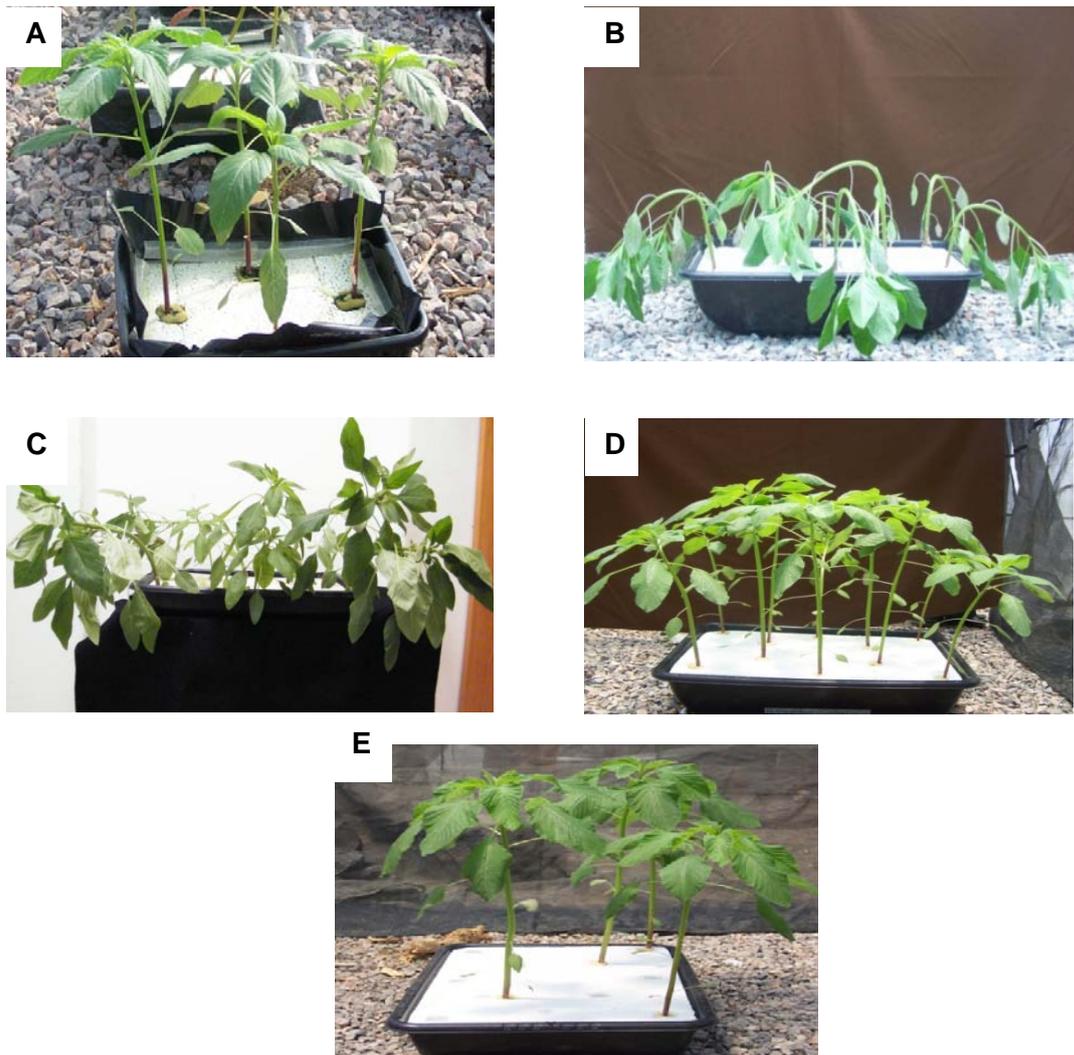


Figura 1. Cultivo de *Amaranthus cruentus* en hidroponía. A) Plantas control tratadas solamente con solución salina (0 mM de NaCl) y plantas tratadas con solución salina más 150 mM de NaCl a diferentes tiempos. B) 1 h, C) 10 h, D) 24 h y E) 7 días.

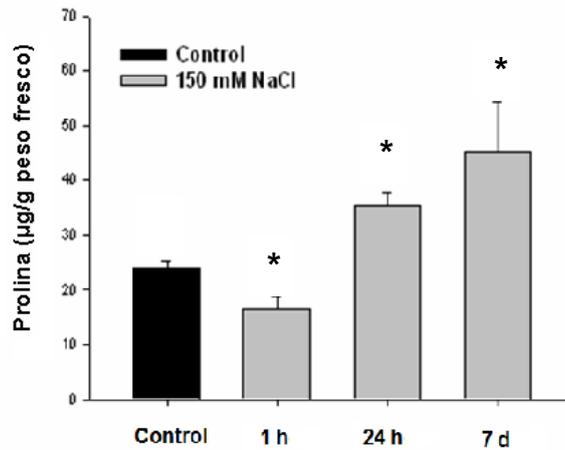
crecimiento mayor que las plantas control. Por lo que se puede considerar al amaranto como una planta glicófita tolerante a la salinidad.

3.2 Contenido de prolina y azúcares solubles totales en hojas de amaranto

Con el fin de investigar si la prolina y los azúcares se acumulan en amaranto para regular la homeostasis celular en respuesta al estrés salino, se determinaron sus concentraciones. La concentración de prolina en la hoja de amaranto a la primera hora disminuyó un 30 %, posteriormente aumentó un 50 % a las 10 h y 90 % a los 7 d con respecto al control (Figura 2A). El contenido de prolina no es tan relevante como el reportado para *Capsicum annuum* bajo condiciones de estrés salino con una acumulación de hasta 230 % (Medina, 2007). Jimenez-Bremont y col (2006) encontraron que el contenido de prolina en hoja en frijol sometido a 150 mM de NaCl no cambia, sin embargo encontraron una acumulación de prolina del 300 % en el tallo y en la raíz. Aghaei y col (2008) reportaron que no aumenta la concentración de prolina en hoja de papa en la variedad Concord sometida a diferentes tratamientos de NaCl (0, 30, 20, 60, 90 y 120 mM de NaCl), sin embargo, en raíz la concentración de prolina aumento en base a las concentraciones de NaCl que se utilizaron.

En relación al contenido de azúcares solubles en la hoja de amaranto no se observó una acumulación dentro de las primeras 24 h de tratamiento con NaCl, permaneciendo sin variaciones (Figura 2B), no obstante, al séptimo día de tratamiento se observó un incremento de aproximadamente 60 % con respecto al control. La acumulación de azúcares solubles fue determinada por Aghaei y col (2008) en hoja y raíz de dos variedades de papa sometidas a estrés con NaCl (Concord y Kennebec), en la cual reportaron una acumulación del 110 % con respecto a la muestra control de azúcares solubles en hoja en la variedad Kennebec tratada con 90 mM de NaCl. Los osmolitos en las células mantienen el balance interno de agua, ayudan a restaurar el medio iónico y a preservar la actividad de las enzimas (Rodríguez y col, 2005; Somero y Yancey, 1997). Los compuestos biocompatibles que se acumulan en la célula con mayor frecuencia son la sacarosa, la prolina y la glicina-betaina, entre otras moléculas (Munns, 2002). En varias halófitas, la prolina y la glicina-betaina se acumulan a altas concentraciones en las hojas (arriba de 40 mM), lo que contribuye a equilibrar la presión osmótica (Flowers y col, 1997). En glicófitas, la concentración de solutos compatibles que se acumulan no son altos (alrededor de 10 mM), pero si se distribuyen exclusivamente en el citoplasma, pueden generar una presión osmótica significativa para funcionar como osmolitos (Munns, 2008).

A)



B)

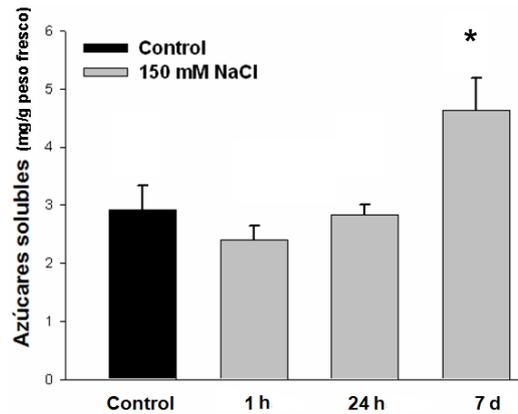


Figura 2. Determinación de prolina y azúcares totales en hoja de *A. cruentus* de la muestra control y de las muestras sometidas a estrés salino. El tratamiento se llevo acabo a una concentración de 150 mM de NaCl durante un tiempo de 1 h, 24 h y 7 d. A) prolina (µg/g de peso fresco) y B) azúcares solubles totales (mg/g de peso fresco). El * indica diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) con respecto al control, empleando la prueba t.

Las bajas concentraciones de estos solutos presumiblemente tienen otros papeles, se ha propuesto que actúan en la estabilización de las estructuras terciarias de las proteínas, funcionando como osmoprotectores (Yokoi y col, 2002; Rhodes y Nadolska-Orczyk, 2002). La acumulación de osmolitos en las plantas no es instantánea, a menudo se produce cuando las lesiones celulares se hacen evidentes (Delauney y Verma, 1993). El soluto más barato energéticamente en los suelos salinos es el Na⁺ y el Cl⁻, el secuestro de iones como el sodio pueden aumentar la presión osmótica de las plantas, pero este es tóxico en el citosol, en contraste con los solutos orgánicos compatibles que no son tóxicos, pero son energéticamente mucho más costosos (Tester y Davenport, 2003; Rodríguez y col, 2005).

3.3 Identificación de las proteínas expresadas diferencialmente

Con el fin de evaluar la calidad de las proteínas extraídas, éstas fueron analizadas en geles en una dimensión (Figura S1). Una vez comprobada la calidad y cuantificada la cantidad de las proteínas se procedió a la separación en dos dimensiones (2-DE). En la Figura 3 se muestra un gel representativo del perfil de proteínas 2-DE de hojas de amaranto donde fueron detectados 290 manchas con la tinción de Coomassie Coloidal. Las flechas indican proteínas diferenciales encontradas en el análisis de las muestras a diferentes tiempos de estrés, los patrones de cada uno de ellos se muestran en la Figura S2. En total se encontraron 53 manchas diferenciales, de éstas 8 mostraron diferencia con respecto a la muestra control, 12 manchas contra 1 h, 9 manchas contra 10 h, 10 manchas contra 24 h y 14 manchas contra 7 d, con un cambio en el volumen de +/- 50 % y con un volumen mayor al 0.2 % del porcentaje del volumen total en pixeles, dando un total de 34 manchas diferenciales sin repetir (Figura 4; Tabla S1). En la Figura 4 se muestran los cambios en la concentración de proteínas de las manchas expresados diferencialmente y analizados mediante espectrometría de masas. Las manchas identificadas mediante LC/ESI-MS/MS se muestran en la Tabla 2.

La mancha 13 fue identificada como una nucleósido difosfato cinasa del grupo I (NDPK1), mostró un aumento del 50 % a los 7 d de tratamiento con NaCl con respecto a 1 h. La NDPK1, pertenece al grupo de las cinasas, se encuentra localizada en el citosol, cataliza la transferencia de un fosfato de un nucleósido trifosfato a un nucleósido difosfato, aparentemente está involucrada en el proceso de desarrollo, división celular y su expresión se ha visto aumentada en respuesta a la sequía o al estrés salino (Hammargren, 2007; Huerta y col, 2010).

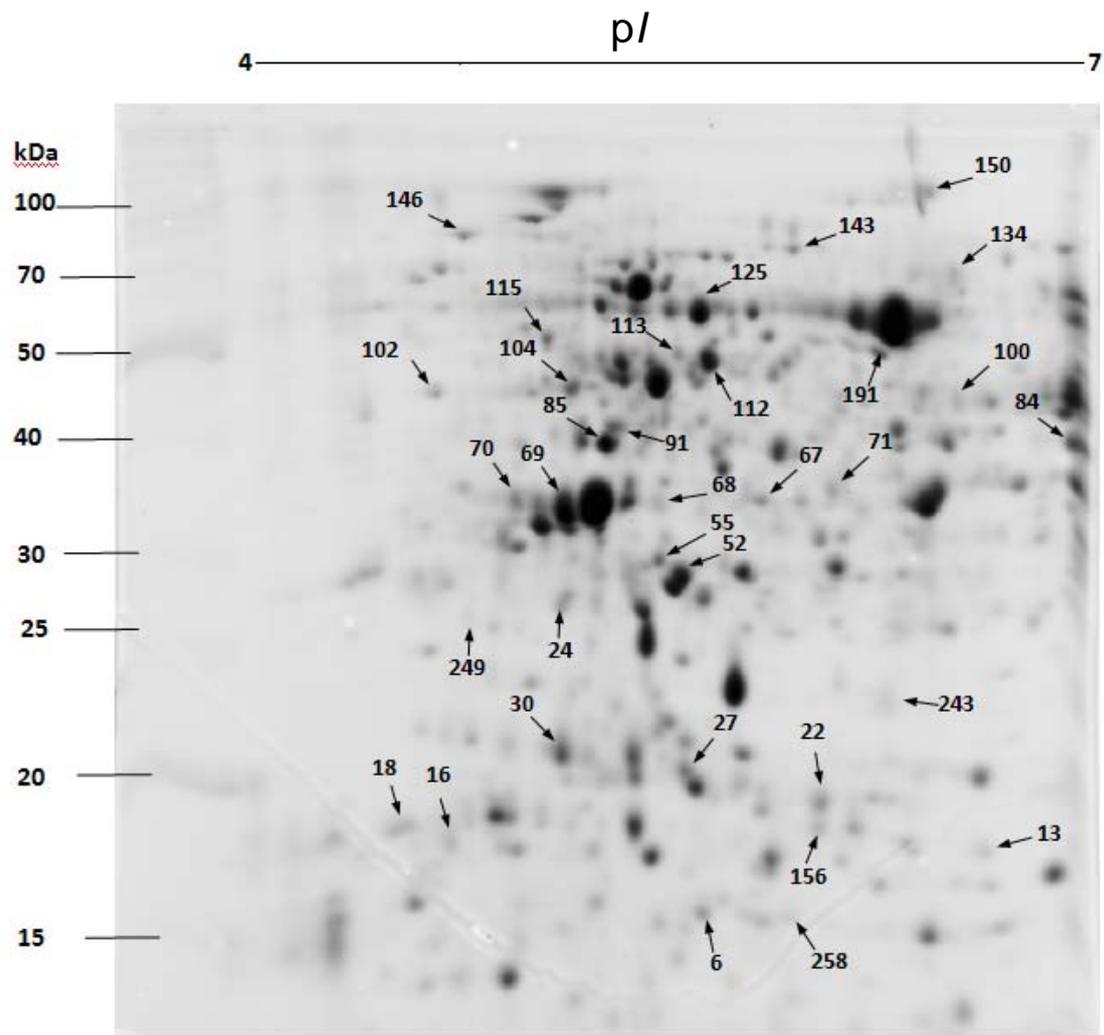


Figura 3. Perfil en 2-DE de las proteínas de hoja de *Amaranthus cruentus*. Las flechas indican las manchas que mostraron diferencias cuantitativas de +/- 50 % con respecto a la muestra control y entre las mismas condiciones. Con un volumen mayor al 0.2 % del porcentaje del volumen total en píxeles. El experimento se realizó por triplicado.

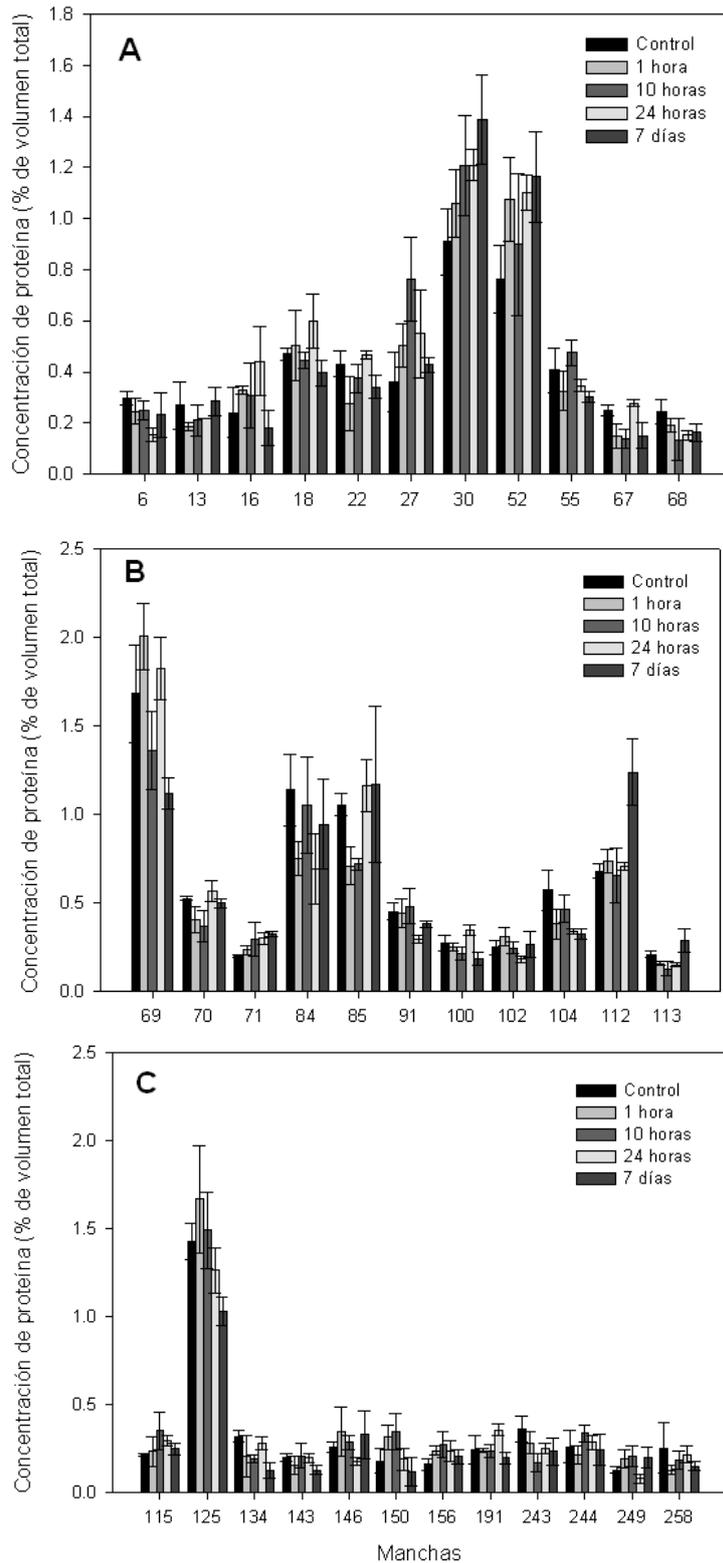
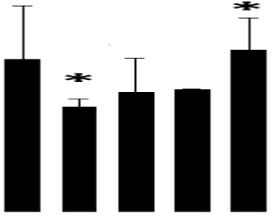
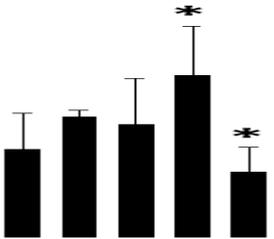
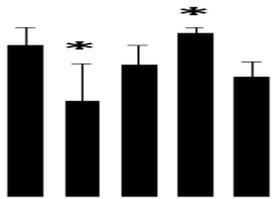
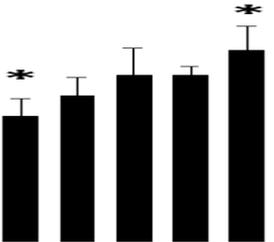
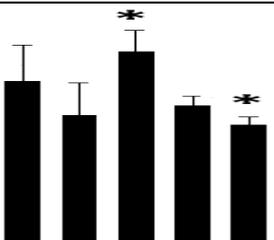
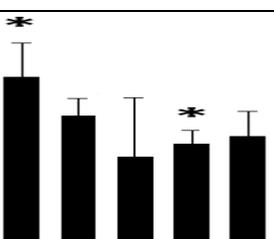
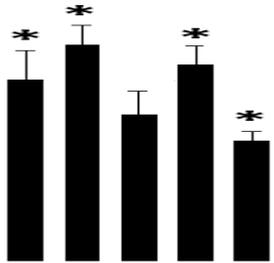
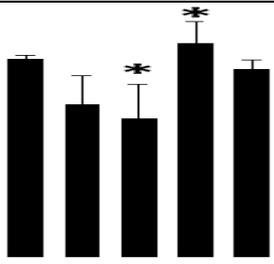


Figura 4. Abundancia relativa de las manchas diferenciales. Los histogramas muestran las diferencias en la cantidad de proteína de hoja, seleccionadas para análisis mediante espectrometría de masas. A) manchas del 6 al 68, B) manchas del 69 al 113 y C) manchas del 115 al 258.

Tabla 2.- Proteínas identificadas y su cambio relativo en hoja de amaranto sometidas a 150 mM de NaCl

Mancha ^a	Proteína	Organismo	Número de acceso ^b	Exp. kDa/pI ^c	Teórico kDa/pI ^d	Score ^e	PM ^f	SC ^g (%)	Abundancia relativa ^h
									C 1 10 24 7
13	Nucleósido difosfato cinasa del grupo I	<i>Populus trichocarpa</i>	gi 224121906	17.9/6.6	17.0/6.17	178	7(5)	34	
16	50S ribosomal L12	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 133085	18.0/4.7	19.9/5.5	78	4(1)	21	
22	Proteína de unión FK506	<i>Ricinus communis</i>	gi 255576172	19.5/6.1	16.1/6.08	126	2(2)	13	

30	Rieske FeS-precursor	<i>Spinacia oleracea</i>	gi 21311 significativos	21.0/5.1	26.6/6.94	154	3(3)	17	
55	Ascorbato peroxidasa citosólica	<i>Suaeda salsa</i>	gi 14324146	30.0/5.4	27.5/5.38	149	4(3)	17	
68	Glioxalasa I	<i>Arabidopsis thaliana</i>	gi 9828630	35.0/5.5	40.2/6.97	72	3(1)	7	

69	Pirofosfatasa inorgánica	<i>Populus trichocarpa</i>	gi 224103823	34.0/5.1	33.6/6.85	89	2(1)	7	
70	Pirofosfatasa inorgánica	<i>Vitis vinifera</i>	gi 225468688	35.0/4.9	31.8/6.01	67	4(1)	20	

^a Números de las manchas correspondientes a la figura 4 y 5. ^b Número de acceso correspondiente a la base de datos del NCBIInr. ^c Masa experimental (kDa) y pl de las proteínas identificadas. ^d Masa teórica (kDa) y pl de las proteínas identificadas, dado por la base de datos del NCBIInr. ^e Escore del motor de búsqueda MASCOT (P<0.05 cuando el score >50). ^f Número de péptidos que hicieron blanco (péptidos que contribuyen al escore). ^g Porcentaje de cobertura de la(s) secuencia(s) de los péptidos que hicieron blanco. ^h Media de la abundancia relativa de las proteínas y el error estándar. El * muestra las diferencias estadísticamente significativas, con una P<0.05.

El aumento de la expresión de la NDPK 1, se ha relacionado con la reacción del arroz a la patogénesis bacteriana (Cho y col, 2004). Harris y col (1994) reportaron que la expresión de la NDPK en jitomate aumenta después de producirle un daño mecánico. La actividad de la NDPK 2 de *Arabidopsis thaliana* está asociada con la señalización de peróxido de hidrógeno mediada por MAPK en plantas, el sobre expresar la NDPK 2 disminuye la acumulación de especies reactivas de oxígeno (Moon y col, 2003).

Se identificó a la mancha 16 como una proteína 50S ribosomal L12, la cual muestra una disminución del 60 % a las 24 h con respecto a los 7 d. Aghei y col (2008), en un estudio realizado a dos variedades de papa, reportaron la disminución de la concentración de esta proteína cuando fueron sometidas a 90 mM de NaCl. Los ribosomas proveen un marco para la biosíntesis de proteínas, dentro de la subunidad larga se encuentran las proteínas L7/L12, las cuales son necesarias para la síntesis óptima de las proteínas y para el funcionamiento correcto de los factores de elongación (Bocharov y col, 2004). Estos autores sugieren que el estrés salino modula la síntesis de proteínas (Aghei y col, 2008).

La mancha 22 se identificó como la proteína de unión FK506, la cual mostro un aumento del 68 % a las 24 h con respeto a 1 hora. La proteína FK506 o FKBP (Proteínas de unión FK506), pertenecen a la familia de las peptidil prolil cis/tras isomerasa (PPIasas), las cuales aceleran el doblamiento de proteínas, afectan la función y estructura de proteínas y participan en la transducción de señales. Provee a la célula junto con las chaperonas, la maquinaria necesaria para corregir el doblamiento erróneo de las proteínas (Breiman y Camus, 2001). Se ha descrito que tienen importantes funciones en la germinación, el desarrollo y la respuesta al estrés (Gollan y Bhave, 2010). La proteína FKBP se ha encontrado en el citosol, en el núcleo, en cloroplastos, en el retículo endoplasmático y en la mitocondria (Kurek y col, 1999). La mutación en la FKBP70 en *A. thaliana* afectó su desarrollo, impidiendo su sobrevivencia en condiciones normales de de crecimiento (Vittorioso y col, 1998).

La mancha 30 corresponde a la proteína Rieske FeS, la cual incrementó su intensidad a los 7 d con respecto a la muestra control en un 50 %, esta proteína es componente del complejo del citocromo bf de la membrana tilacoidal de los cloroplastos, la proteína Rieske se encuentra involucrada en la transferencia de electrones entre la plastoquinona y el citocromo f, se encuentra presente en cianobacterias y cloroplastos (Madueño y col, 1993). Este complejo esta compuesto por el citocromo b₆, el citocromo f y las subunidades Rieske o proteínas hierro-azufre (Madueño y col, 1992). Bajo condiciones favorables los electrones que fluyen a través de la cadena transportadora de electrones se consumen en el ciclo de Calvin, minimizando el flujo de electrones al O₂, bajo condiciones en las que el ciclo de Calvin se

inhibe (sequía o bajas concentraciones de CO₂), el transporte de electrones es reprimido para minimizar el flujo de electrones al O₂ (Golding y Johnson, 2003).

La mancha 55 fue identificada como una ascorbato peroxidasa (APX), la cual se mantuvo sin cambios aparentemente en relación con la muestra control, no obstante existe diferencia estadística con la muestra tratada con NaCl durante 10 h y las muestras tratadas durante 1 h, 24 h y 7 d. El estrés abiótico induce la producción de especies reactivas de oxígeno, las cuales causan daño celular, pero también pueden actuar como moléculas de señalización para la respuesta al estrés, la APX se encuentra involucrada en la reducción del H₂O₂ a agua, utilizando al ascorbato como un donador de electrones (Karpinski y col, 1997). Se han encontrado incrementos en la concentración de APX y otras peroxidases bajo diferentes condiciones de estrés por ozono, sequía y salino (Huerta, 2010). La APX es altamente sensible a la inactivación por ROS y con frecuencia es insuficiente para proteger el aparato fotosintético de la fotoinhibición durante el estrés severo (Shikanai y col, 1998).

La mancha 68 fue identificada como una Glioxalasa I (Glx I) la cual disminuyó su intensidad en un 50 % entre la muestra control y 24 h. La Glx cataliza la conversión del metil glioxal a D-lactato. A través de un sistema de dos enzimas, la glioxalasa I (Glx I) y glioxalasa II (GlxII). La GlxI convierte el hemiacetal a S-D-lactoilglutathion y la GlxII lo convierte a D-lactato y glutathion (Himo, 2001). El metilglioxal (2-oxoaldehído) es sintetizado durante la glicólisis, un aumento puede producir efectos tóxicos reaccionando con el RNA, DNA y proteínas (Takatsume y col, 2010). La expresión del gen de la glioxalasa I (*GLO1*) de *Saccharomyces cerevisiae* es inducido específicamente por estrés osmótico vía MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Inoue y col, 1998). La expresión de glioxalase I en *Brassica juncea* aumenta en respuesta a estrés salino e hídrico (Veena, 1999).

Las manchas 69 al igual que la 70 fueron identificadas como pirofosfatasa inorgánica, la cual cataliza la conversión de una molécula de pirofosfato a dos iones fosfato, esta enzima se encuentra involucrada en el metabolismo de lípidos, absorción de calcio y en la síntesis de ADN (Gómez-García, 2006). Plantas transgénicas que sobre expresan el gen *AVP1* de la H⁺-pirofosfatasa vacuolar de *A. thaliana*, resulta en plantas más tolerantes a la salinidad y sequía (Gaxiola y col, 2001). La expresión del gen *TsVP1* en Tabaco aumento su tolerancia a tratamientos con 200 mM de NaCl (Gao y col, 2006). Oliveira y col (2001) reportaron un aumento en la actividad de la V-ATPasa de *Vigna unguiculata* en el séptimo día de germinación en estrés salino (100mM de NaCl).

IV Conclusiones

Las plantas de *A. cruentus* sometidas a estrés salino perdieron su turgencia, la cual fueron capaces de recuperarla a las 24 h de exposición y la mantuvieron hasta el día 7. Este mecanismo es característico de tolerancia a estrés.

El análisis de osmolitos indica que no hay acumulación de prolina y azúcares solubles, aunque si se observan diferencias en el contenido de éstos durante el tratamiento con 150 mM de NaCl. La planta de amaranto activa otros mecanismos para contrarrestar la pérdida de osmolaridad y de turgencia.

El análisis del perfil de proteínas en 2 DE, es una herramienta importante para el análisis cuantitativo de las proteínas expresadas diferencialmente en estrés salino. En este trabajo reportamos la identificación de 34 proteínas diferenciales mediante espectrometría de masas en tándem, que incluyen a proteínas de respuesta a estrés (NDPK, FK 506, APX y GlxI), relacionadas con el correcto plegamiento (FK 506), fotosíntesis (Rieske FeS), síntesis de proteínas (50S ribosomal L 12) y algunas involucradas en la transducción de señales (NDPK y FK 506).

El transporte de electrones en la fotosíntesis de las plantas de *Amarantus cruentus* es afectada durante el estrés salino.

V REFERENCIAS

- Abbasi F. M., Komatsu S. A proteomic approach to analyze salt responsive proteins in rice leaf sheath. *Proteomics*. 2004; 4 (7): 2072-2081.
- Aghaei K., Ehsanpout A. A., Komatsu S. Proteome analysis of potato under salt stress. *Journal of Proteome Research*. 2008; 7: 4858-4868.
- Barba de la Rosa A. P., Fomasgaard I. S., Laursen B., Mortensen A. G., Martínez O. L., Sánchez S. C., Herrera M. A., Castañeda G. J., De León R. A. Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) as an alternative crop for sustainable food production: Phenolic acids and flavonoids with potential impact on its nutraceutical quality. *Journal of Cereal Science*. 2009; 49: 117-121.
- Barba de la Rosa A.P., Barba-Montoya A., Martínez-Cuevas P., Hernández-Ledesma B., León-Galván F., De León-Rodríguez A., González C. Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: antihypertensive role of amaranth peptides. *Nitric Oxide. Biology and Chemistry*. 2010; 23: 106-111.
- Bartels D., Sunkar R. Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Review in Plant Sciences*. 2005; 24: 23-58.
- Bocharov E.V., Sobol A.G., Pavlov K.V., Korzhnev D.M., Jaravine V.A., Gudkov A.T., Arseniev A.S. From Structure and Dynamics of Protein L7/L12 to Molecular Switching in Ribosome. *The Journal of Biological Chemistry*. 2004; 279: 17697-17706.
- Bohnert H.J., Jensen R.G. Metabolic engineering for increased salt tolerance. *Aut. J. Plant Physiol*. 1996; 23: 661-667.
- Breiman A., Camus I. The involvement of mammalian and plant FK506-binding proteins (FKBPs) in development. *Transgenic Research*. 2001; 11: 321-335.
- Cerezo G. M. Caracterización de los sistemas de absorción de nitrato en los cítricos e influencia de la salinidad sobre los mismos. Memoria de Doctorado. Departamento de ciencias experimentales área de biología vegetal. Castellón, España. 1998: pp 1-131.
- Cho S.M., Shin S.H., Kim K.S., Kim Y.C., Eun M.y., Cho B.H. Enhanced expression of a gene encoding a nucleoside diphosphate kinase 1 (OsNDPK1) in rice plants upon infection with bacterial pathogens. *Molecular Cell*. 2004; 18: 390-395.
- Delauney A., Verma D.P.S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal*. 1993; 4: 215-223.

- Edward P., Glenn J., Jed B. J. Salt Tolerance and Crop Potential of Halophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 1999; 18 (2): 227-255.
- Flowers T.J., Troke P. F., Yeo A. R. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol*. 1997; 28: 89-121.
- Gao F., Gao Q., Duan X., Yue G., Yang A., Zhang J. Cloning of an H⁺-PPase gene from *Thellungiella halophila* and its heterologous expression to improve tobacco salt tolerance. *Journal of Experimental Botany*. 2006; 57 (12): 3259-3270.
- Gaxiola R.A., Li J.S., Undurrag S., Dang L.M., Allen G.J., Alper S.L., Fink G.R. Drought-and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 11444-11449.
- Glenn E.P., Jed B.J. Salt Tolerance and Crop Potential of Halophytes. *Critical Reviews in Plant Sciences*. 1999; 18 (2): 277-255.
- Golding A. J., Johnson G.N. Down-regulation of linear and activation of cyclic electron transport during drought. *Planta*. 2003; 218: 107-114.
- Gollan P.J., Bhave M. Genome-wide analysis of genes encoding FK 506-binding proteins in ric. *Plant Mol Biol*. 2010; 72; 1-16.
- Gómez-García M., Losada M., Serrano A. A novel subfamily of monomeric inorganic pyrophosphatases in photosynthetic eukaryotes. *Biochem. J*. 2006; 395; 211-221.
- Hammargren J. Novel Functions of the Mitochondrial Nucleoside Diphosphate Kinase in Plants. Doctoral thesis. *Swedish University of Agricultural Sciences*. Uppsala, Suecia. 2007: pp 11-56.
- Harris N., Taylor J.E., Roberts J.A. Isolation of a mRNA encoding a nucleoside diphosphate kinase from tomato that is up-regulated by wounding. *Plant Molecular Biology*. 1994; 25: 739-742.
- Hasegawa P. M., Bressan R. A., Zhu J. K., Bohnert H. J. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 2000; 51: 463-499.
- Himo F., Siegbahn P.E.M. Catalytic Mechanism of Glyoxalase I: A Theoretical Study. *J. Am. Chem. Soc*. 2001; 123: 10280-10289.
- Huerta-Ocampo J.A., Galván-León M.F., Ortega-Cruz L.B., Pacheco-Barrera A., De León-Rodríguez A., Mendoza-Hernández G., Barba de la Rosa A.P. Water stress induces up-regulation of DOF and MIF1 transcription factors and down-regulation of proteins involved in secondary metabolism in

- amaranth roots (*Amaranthus hypochondriacus* L.). *Plant Biology*. 2010, doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00391.x
- Inoue Y., Tsujimoto Y., Kimura A. Expression of the Glyoxalase I Gene of *Saccharomyces cerevisiae* Is Regulated by High Osmolarity Glycerol Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Osmotic Stress Response. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998; 273: 2977-2983.
- Jelloulia N., Jouiraa H. B., Skourib H., Ghorbela A., Gourgourib A., Mlikia A. Proteomic analysis of Tunisian grapevine cultivar Razegui under salt stress. *J. Plant Physiol*. 2008; 165: 471-481.
- Jiménez-Bremont J.F., Becerra-Flora A., Hernández-Lucero E., Rodríguez-Kessler M., Acosta-Gallegos J.A., Ramírez-Pimentel J.G. Proline accumulation in two vean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine. *Biologia Plantarum*. 2006; 50 (4): 763-766.
- Karpinski S., Escobar C., Karpinska B., Creissen G., Mullineaux P. M. Photosynthetic Electron Transport Regulates the Expression of Cytosolic Ascorbate Peroxidase Genes in Arabidopsis during Excess Light Stress. *The Plant Cell*. 1997; 9: 627-640.
- Kazakidou D., Burrage S. The procuton of African Marigold (*Tagetes erecta* L.) by the nutrient film technique. The influence conductivity on growth and carotenoid levels. *Acta Horticulturae*. 1994; 361: 332-333.
- Kim D. W., Rakwal R., Agrawal G.K., Jung Y. H., Shibato J., Jawan N. S., Iwahashi Y., Iwahashi H., Dim D.H., Shim le S., Usui K. A hydroppinic rice seedling culture model system for investigating proteome of salt stress in rice leaf. *Electrophoresis*. 2005; 26 (23): 4521-4539.
- Kong-Ngern K., Daduang S., Wongkham C. H., Bunnag S., Kosittrakun M., Theerakulpisut P. Protein profiles in response to salt stress in leaf sheaths of rice seedlings. *Sci. Asia*. 2005; 31: 403-408.
- Kultz D., Burg M. Evolution of osmotic stress signaling via MAP Kinase cascades. *The Journal of Experimental Biology*. 1998; 201: 3015-3021.
- Kurek I., Aviezer K., Erel N., Herman E., Breiman A. The wheat peptidyl prolyl *cis-trans* isomerase FKBP77 is heat induced and developmentally regulated. *Plant Physiol*. 1999; 119: 693-704.
- Madueño F., Napier J.A., Cejudo F.J., Gray J.C. Import and processing of the precursor of the Rieske FeS protein of tobacco chloroplasts. *Plant Molecular Biology*. 1992; 20: 289-299.

- Madueño F., Napier J. A., Gray J.C. Newly Imported Rieske Iron-Sulfur Protein Associates with Both Cpn60 and Hsp70 in the Chloroplast Stroma. *The Plant Cell*. 1993; 5: 1865-1876.
- Magne C., Larher F. High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical Biochemistry*. 1992; 200: 115-118.
- Maldonado-Cervantes E., Jeong H.J., León-Galván F., Barrera-Pacheco A., De León-Rodríguez A., González de Mejía E., de Lumen B. O., Barba de la Rosa A. P. Amaranth lunasin-like peptide internalizes into the cell nucleus and inhibits chemical carcinogen-induced transformation of NIH-3T3 cells. *Peptides*. 2010; 31: 1635-1642.
- Medina M. Variaciones en el contenido relativo de agua y la concentración de prolina en *Capsicum annuum* L. inducido por NaCl. *Amaldoa*. 2007; 14 (2): 251-258.
- Moon H., lee B., Choi G., Shin D., Prasad D.T., Lee O., Kwad S.S., Kim D.H., Nam J., Bahk J., Hong J.C., Lee S.Y., Cho M.J., Lim C.O., Yun D.J. NDP Kinase w interacts with two oxidative stress-activated MAPKs to regulate cellular redox state and enhances multiple stress tolerance in transgenic plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003; 100: 358-363.
- Munns R. Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Enviroment*. 2002; 25: 239-250.
- Munns R., Tester M. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2008; 59: 651-681.
- Oliveira O., Menezes S., Farias de Aragao M., Orellano E., Silva L., Fernandes de Melo D. Salt modulation of vacuolar H⁺-ATPase and H⁺-Pyrophosphatase activities in *Vigna unguiculata*. *J. Plant Physiol.* 2001; 158: 545-551.
- Pang Q., Chen S., Dai S., Chen Y., Wang Y., Yan X. Comparative Proteomics of Salt Tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Thellungiella halophila*. *J Proteome Res*. 2010; 9: 2584-2599.
- Parida A. K., Das A. B., Mitra B. Effects of salt on growth, ion accumulation, photosynthesis and leaf anatomy of the mangrove *Bruguiera parviflora*. *Trees-Struct Funt*. 2004; 18 (2): 167-174.
- Parker R., Floers T. J., Moorem A. L., Harpham N. V. J. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. *J. Exp. Bot.* 2006; 57: 1109-1118.

- Pessarakli M., Szabolcs I. In: Pessarakli M, editor. Hand-book of Plant and Crop Stress. Marcel Dekker, New York. 1999; pp. 1-15.
- Reddy B., Peng Z. Proteome and Phosphoproteome Differential Expression Under Salinity Stress in Rice (*Oryza sativa*) Roots. *J Proteome Res.* 2006; 6: 1718-1727.
- Rhodes D., Nadolska-Orczyk A., Rich P.J. Salinity, osmolytes and compatible solute. In: Salinity Environment-Plants-Molecules, editor. *A Lauchli, U Luttge.* 2002: pp. 181-204.
- Rodriguez M., Canales E., Borrás-Hidalgo O. Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Biotechnología Aplicada.* 2005; 22: 1-10.
- Sánchez S.C. Caracterización fisicoquímica y nutracéutica de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus*) cultivado en San Luis Potosí. Tesis de Doctorado. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. SLP, México. 2007: p. 1-93
- Schnetzler K.A., Breen W. M. Food Uses and Amaranth Product Research: A Comprehensive Review. In: Amaranth. Biology, Chemistry, and Technology, editor. Paredes-López, O., Ed.; CRC Press: Boca Ratón, FL; 1994; 9: p. 155-184.
- Shau B. B., Shaw B. P. Insolation, identification and expression analysis of salt-induced genes in *Suaeda maritima*, a natural halophyte, using PCR-based suppression subtractive hybridization. *BMC Plant Biology.* 2009; 9: 69-93.
- Silva S. C., Barba de la Rosa A. P., León G. M., Lumen B. O., De León R. A., González de Mejía E., Bioactive Peptides in Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) Seed. *J. Agric. Good Chem.* 2008; 56: 1233-1240.
- Somero G. N., Yancey P.H. Osmolytes and cell volumen regulation: physiological and evolutionary principles. In: Handbook of Physiology, edito. J. F. Hoffmann and J. D. Jamieson. New York: Oxford University Press; 1997: pp. 441-484.
- Taji T., Seki M., Satou M., Sakural T., Kobayashi M. Comparative genomics in salt tolerance between Arabidopsis and Arabidopsis-Related Halophyte Salt Cress Using Arabidopsis microarray. *Plant Physiol.* 2004; 135 (3): 1697-1709.
- Takatsume Y., Ohdate T., Maeta K., Nomura W., Izawa S., Inoue Y. Calcineurin/Crz1 destabilizes Msn2 and Msn4 in the nucleus in response to Ca²⁺ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* 2010; 427: 275-287.

- Tester M., Davenport R. Na⁺ tolerance and Na⁺ transport in higher plants. *Annals of Botany*. 2003; 91: 503-527.
- Valdés R. S., Segura N. M., Chagolla L. A., Vargas C. A., Martínez G. N., Blanco L. A. Purification, characterization, and complete amino acid sequence of a trypsin inhibitor from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seeds. *Plant Physiol*. 1993; 103 (4): 1407-1402.
- Veena., Vanga S. R., Sopory S. K. Glyoxalase I from Brassica juncea: molecular cloning, regulation and its over-expression confer tolerance in transgenic tobacco under stress. *The Plant Journal*. 1999; 17 (4): 385-395.
- Villanueva O., Arnao I. Purificación de una proteína de 35 kDa rica en lisina, de la fracción albúmina de *Amaranthus caudatus* (kiwicha). *An Fac Med Lima*. 2007; 68 (4): 344-350.
- Vittorioso P., Cowling R., Faure J.D., Caboche M., Bellini C. Mutation in the Arabidopsis PASTICCINO1 gene, which encodes a new FK506-binding protein-like protein, has a dramatic effect on plant development. *Mol Cell Biol*. 1998; 18: 3034-3043.
- Wang W., Vinocur B., Altman A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*. 2003; 218 (1): 1-14.
- Xiong L., Zhu K. J. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment*. 2002; 25: 131-139.
- Xu C., Huang B. Differential proteomic responses to water stress induced by PEG in two creeping bentgrass cultivars differing in stress tolerance. *J Plant Physiology*. 2010; 167 (17): 1477-1485.
- Yokoi S., Bressan R. A., Hasegawa P. M. Salt Stress Tolerance of Plants. *Jircas Working Report*. 2002: pp. 25-33.
- Zhu J. K. Salt and Drought Stress Signal Transduction in Plants. *Annu. Re. Plant Biol*. 2002; 53: 247-73.

ANEXOS

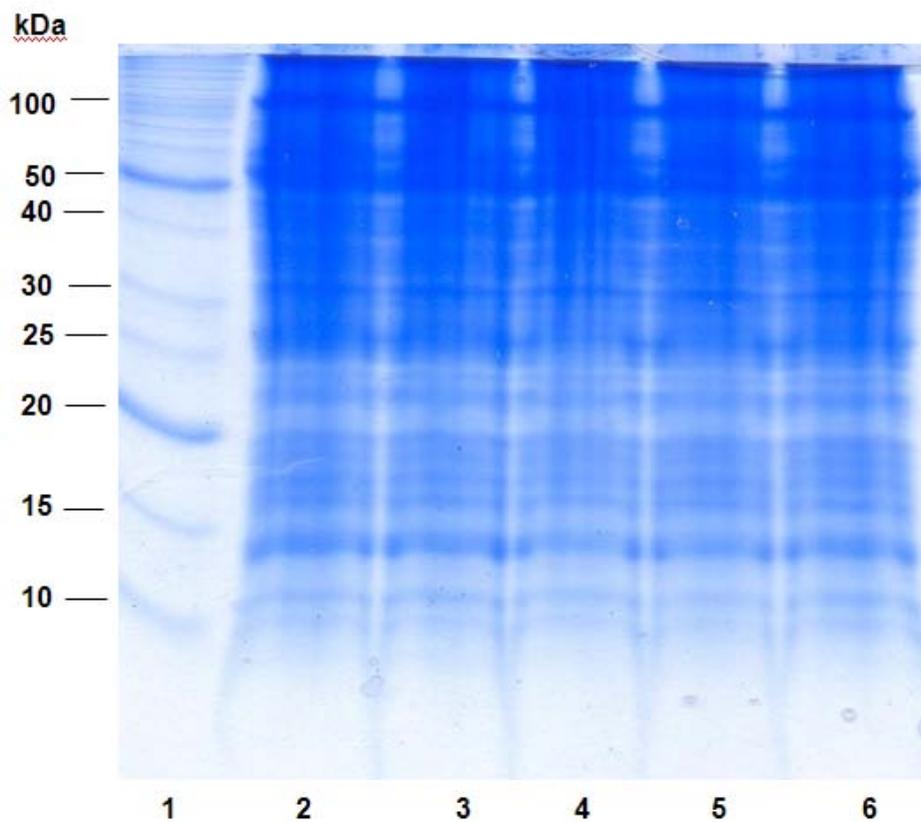


Figura Suplementaria 1. Patrones en una dimensión de las muestras de hoja de amaranto. Carril: 1) MPM, 2) Control (NaCl 0 mM), 3) 1 h, 4) 10 h, 5) 24h y 6) 7 de estrés. Cada una con una concentración final de 2.25 mg/mL.

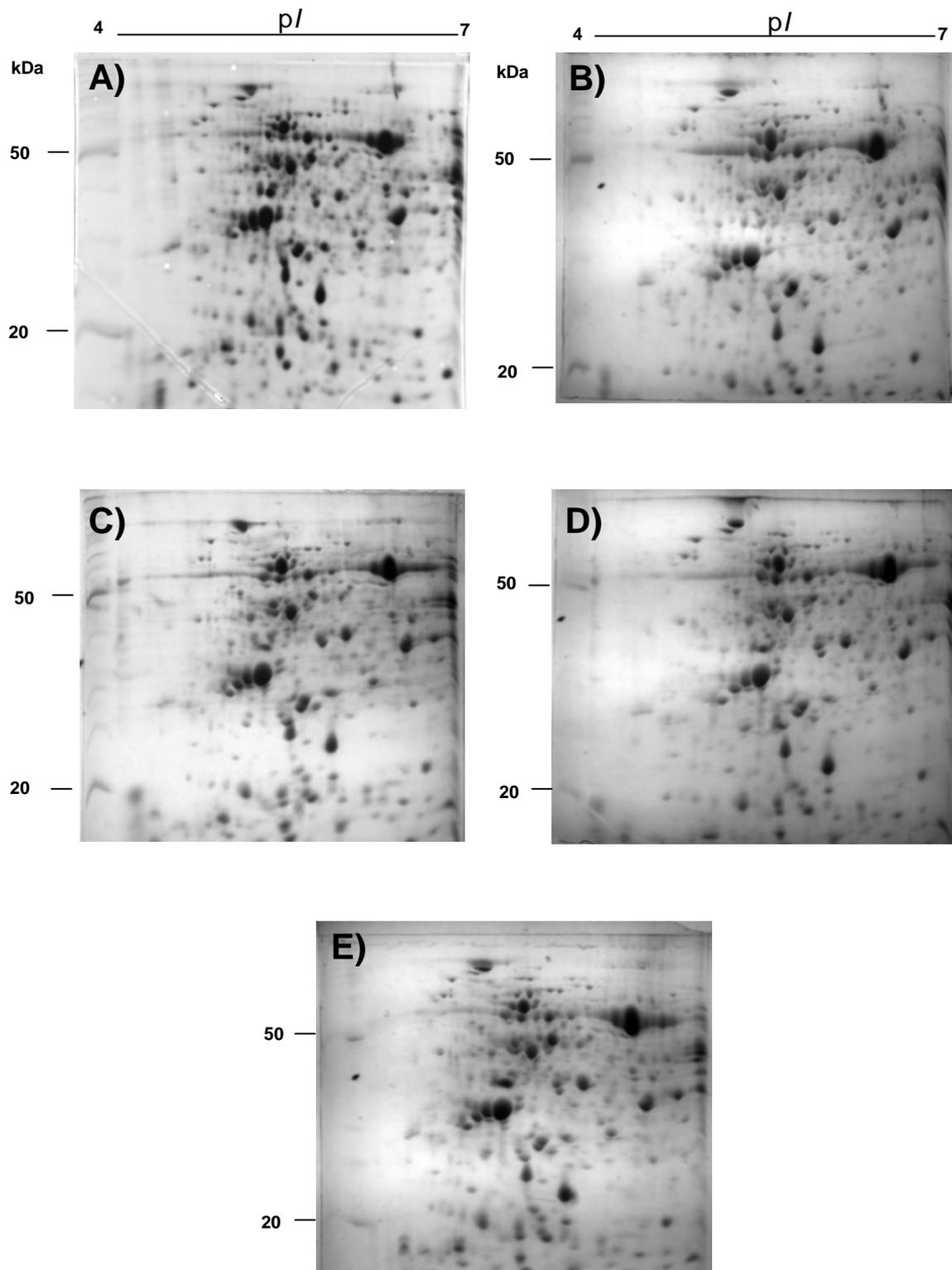


Figura Suplementaria 2. Patrones bidimensionales de proteínas de hoja de amaranto, teñidos con Coomassie Coloidal (Brilliant Blue G-250). A) Control; B) 1 h; C) 10 h; D) 24 h y E) 7 días.

Tabla Suplementaria 1. Manchas diferenciales con respecto al control o entre las muestras analizadas por espectrometría de masas en tándem. En la tabla se muestran las manchas diferenciales con un cambio en el volumen mayor o menor al 50 % y con un volumen mayor al 0.2 % del porcentaje del volumen total en pixeles. (P<0,05)

Muestra	Mancha / Diferencial con respecto a								Total
Control	27/10 h	30/7 d	52/7 d	71/24h	71/7d	112/7d	134/7d	156/1h	8
1 hora	243/10h	13/7d	22/24h	67/24h	84/Con	85/24h	112/7d	113/7d	12
	115/10h	150/7d	244/10h	249/24h	258/24h				
10 horas	67/Con	67/24 h	70/24h	85/24h	112/7d	113/Con	113/7d	134/Con	9
	150/7d	191/24h	243/Con						
24 horas	6/Con	6/10h	16/7d	68/Con	91/Con	91/10h	102/1h	104/Con	10
	112/7d	113/7d	134/7d	146/Con	146/10h				
7 días	16/1h	16/24	18/24h	27/10h	55/10h	67/Con	67/24h	69/Con	14
	69/1h	69/24h	100/24h	104/Con	113/10h	125/1h	134/Con	134/24h	
	143/Con	143/24h	150/1h	150/10h	191/24h				