



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

DIVISIÓN DE POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Genes aislados de *Bouteloua gracilis* bajo déficit
hídrico obtenidos por medio de SSH, son
diferencialmente expresados en estrés abiótico.**

Tesis que presenta

Q.A. Pablo Delgado Sánchez

Para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

Codirector:

Dr. Gerardo Armando Aguado Santacruz

San Luís Potosí, S.L.P., Enero de 2007.



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Genes aislados de *Bouteloua gracilis* bajo déficit hídrico obtenidos por medio de SSH, son diferencialmente expresados en estrés abiótico**” presentada para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por el C.: **Q.A. Pablo Delgado Sánchez** y aprobada el **26 de Enero de 2007** 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.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
(Director de la tesis)

Dr. Gerardo Armando Aguado Santacruz
(Codirector de la tesis)

Dr. J. Sergio Casas Flores
(Asesor de la tesis)

DEDICATORIA

Con mucho amor y cariño

A mis Padres Teresa y Pablo, como siempre incondicionales

A Heidy y a mi hermano Samuel



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 033 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 29 días del mes de enero del año 2007, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. J. Sergio Casas Flores	Presidente	IPICYT
Dr. Gerardo Armando Aguado Santacruz	Secretario	INIFAP
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó el C.

Pablo Delgado Sánchez

sobre la Tesis intitulada:

*Genes Aislados de *Bouteloua gracilis* Bajo Déficit Hídrico Obtenidos por Medio de SSH, son Diferencialmente Expresados en Estrés Abiótico*

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
Dr. Gerardo Armando Aguado Santacruz (INIFAP)

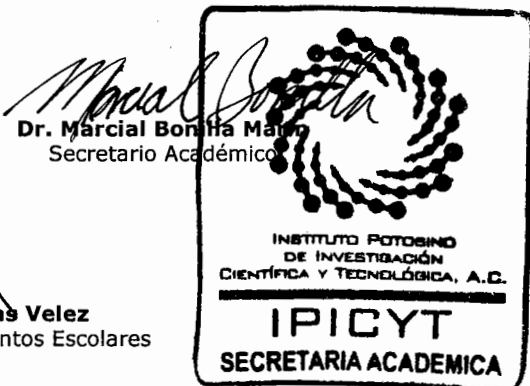
El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLO

Dándose por terminado el acto a las 18:30 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé 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 29 días del mes enero de 2007.

L.C.C. Ivonne Lizette Cuevas Velez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares



Dr. Marcial Borja Malm
Secretario Académico

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, por sus asesorías, consejos, por su gran amistad y el apoyo incondicional para la realización de esta tesis.

Al Dr. Gerardo Armando Aguado Santacruz, por ofrecerme la gran oportunidad de realizar una estancia en su laboratorio. Por su amistad, apoyo y consejos.

Al Dr. J. Sergio Casas Flores por sus sugerencias y el tiempo empleado en la revisión de mi tesis. Su amistad, consejos y apoyo.

Al Dr. Luís Herrera Estrella, por las facilidades para la construcción de la genoteca en su laboratorio.

A mis amigos, en especial a Liro, Gigio y Lalo por su gran amistad y los buenos momentos.

A mis compañeros del Laboratorio 7: Azucena, Alicia, Claudia, Eloisa, Erika, Imelda, Lorena, Maribel, Margarita, Telma y Yadira por su amistad, apoyo y los buenos momentos.

A mis compañeros de la Unidad de Biotecnología-INIFAP Celaya, Alba, Ileana, Griselda, Blanca, Rosa y Javier.

A la familia Soria Santoyo, mil gracias por todo.

A Gaby, por su gran amistad y apoyo.

INDICE

RESUMEN

ABSTRACT

INTRODUCCIÓN	1
MATERIALES Y METODOS	4
Condiciones experimentales para la construcción de la genoteca substractiva (SSH) de plantas isogénicas de <i>Bouteloua gracilis</i> crecidas bajo condiciones de sequía.....	4
Aislamiento de RNA total y mensajero.....	4
Construcción de la SSH.....	4
Secuenciación y análisis bioinformático de los EST's diferenciales.....	5
Análisis de expresión diferencial de los EST's mediante RT-PCR.....	6
Análisis de la expresión de genes substractivos de <i>Bouteloua gracilis</i> con diferentes tratamientos de estrés abiótico.....	6
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	8
Establecimiento de condiciones de estrés hídrico de <i>Bouteloua gracilis</i> para el desarrollo de la Genoteca Sustractiva (SSH).....	8
Identificación de los genes inducidos en la planta <i>Bouteloua gracilis</i> en condiciones de sequía.	9
Clasificación de las secuencias de acuerdo a su posible función.....	9

Análisis de la expresión de genes de <i>Bouteloua gracilis</i> a - 2.0 MPa.....	11
Análisis de la expresión de los genes de la planta <i>Bouteloua gracilis</i> bajo diferentes tratamientos.....	11
Unigen 6 (Pirofostasa traslocadora de protones).....	12
Unigen 2 (Factor de ADP de ribosilación).....	13
Unigen 3 (Factor de Splicing 3B subunidad 2).....	14
Unigen 23 (Cisteín proteinasa).....	14
Unigen 24 (Proteína NFU).....	15
Unigen 21 (Subunidad alfa tipo 2 del proteosoma).....	15
Unigen 8 (Proteína chaperona ortóloga DnaJ).....	16
Unigen 25 (ATPasa subunidad beta).....	17
CONCLUSIONES	18
FIGURAS	19
TABLAS	23
REFERENCIAS	25

**Genes aislados de *Bouteloua gracilis* bajo déficit hídrico
obtenidos por medio de SSH, son diferencialmente expresados
en estrés abiótico**

Delgado-Sánchez Pablo ¹, Jiménez-Bremont Juan Francisco¹ y Aguado-Santacruz Gerardo Armando².

¹*División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa de San José 2055, Apartado Postal 3-74 Tangamanga, 78210, San Luís Potosí, San Luís Potosí, México.*

²*Campo Experimental Bajío-Unidad de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Carretera Celaya-San Miguel de Allende Km. 6.5, 38010, Celaya, Guanajuato, México.*

Autor de correspondencia:

Dr. Gerardo Armando Aguado Santacruz

Palabras Clave: *Bouteloua gracilis*, Estrés Abiótico, Hibridación substractiva por supresión, Sequía.

Abreviaciones: ABA, ácido abscísico; PEG8000, Polietilenglicol 8000; EST, Etiqueta de secuencia expresada

Resumen

La sequía es el principal factor de estrés abiótico que afecta el desarrollo y la productividad los de cultivos económicamente importantes. Las respuestas a nivel celular y molecular que se manifiestan cuando una planta se encuentra en sequía son cambios morfológicos, ajuste en el transporte de iones y cambios metabólicos, entre otros. Todos estos cambios están regidos por la expresión de diversos grupos de genes que ayudan a las plantas a tolerar cambios ambientales externos. El uso de herramientas moleculares ha permitido la identificación de genes asociados con la tolerancia a la sequía. Por lo que el emplear plantas que sean tolerantes a factores ambientales extremos, puede contribuir a aumentar nuestro entendimiento en los mecanismos moleculares que confieren la tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico. Debido a que *Bouteloua gracilis* es una gramínea originaria de México que se caracteriza por ser una planta altamente tolerante a la sequía, la hace un modelo muy atractivo para el estudio del estrés generado por sequía, por ello se desarrollo una genoteca substractiva a partir de esta especie, empleando el cDNA de plantas crecidas bajo condiciones de déficit hídrico (muestra problema) y plantas mantenidas en riego (muestra control). Se aislaron 131 clonas potencialmente diferenciales las cuales fueron secuenciadas, analizadas y agrupadas en contigs, obteniéndose un total de 47 unigenes. Del total de las clonas 25 son secuencias de genes conocidos, mientras que 22 unigenes son secuencias no reportadas en las bases de datos. Las secuencias aisladas codifican para proteínas que participan en procesos de señalización (4%), metabolismo (4%), fotosíntesis (2%), transporte (13%), respuesta a estrés (11%) y síntesis de proteínas (4%). La expresión diferencial de nueve de estos genes incluyendo una pirofostasa translocadora de protones, un factor de ribosilación de ADP, un factor de splicing, una cisteín proteinasa, una proteína NFU, una subunidad del proteosoma, una chaperona DnaJ y una ATPasa fueron confirmadas por RT-PCR. Además, se evaluó la expresión de estos genes en respuesta a diferentes estímulos, como estrés por frío, calor, salinidad, estrés osmótico y a la aplicación exógena de ácido abscísico. De manera interesante la mayoría de los genes analizados muestran diferentes patrones de expresión en respuesta a los tratamientos empleados.

ABSTRACT

Drought, constitutes the main abiotic stress affecting growth and productivity of economically important crops. Osmotically stressed plants display different cellular and molecular responses including morphological and metabolic changes, and ion transport adjustment. All these changes are governed by the expression of several genes involved in plant tolerance to environmental stresses. The usage of molecular tools has allowed the identification of some genes involved in drought tolerance. The understanding of the molecular mechanisms by which plants acquire tolerance to abiotic stresses, can be approached using naturally tolerant plants such as *Bouteloua gracilis*, which has been characterized as drought tolerant. In present work we developed a subtractive library of *B. gracilis* leaves from drought stressed seedlings, using the cDNA from plants grown under stress as tester and the cDNA of plants maintained at field capacity as driver. We isolated and sequenced 131 clones, which were analyzed and grouped into contigs representing 47 unigenes. From these genes, 25 belonged to known sequences while the other 22 were new sequences not reported in the GenBank. The isolated genes encode for proteins involved in signaling, metabolism, photosynthesis, transport, stress responses and protein biosynthesis. The differential expression of nine of these genes including a proton translocating pyrophosphatase, ADP-ribosylation factor, splicing factor 3B subunit 2, cysteine proteinase, NFU protein, proteasome subunit alpha type 2, chaperone protein dnaJ and an ATPase subunit beta was assessed by RT-PCR. In addition, we evaluated the expression of these genes in response to different stimuli such as cold, heat, salinity, osmotic stress and in response to abscisic acid. Interestingly, most of the analyzed genes display diverse expression patterns in response to the applied treatments.

Introducción

Aunque el agua es el compuesto más abundante de nuestro planeta, su escasez en el suelo es el factor más limitante para la producción agrícola a nivel mundial. Aproximadamente, la mitad de las comunidades vegetales terrestres sufren regularmente extensos períodos de déficit hídrico (Schulze *et al.*, 1987), constituyéndose como la principal causa de pérdidas en el rendimiento de los cultivos económicamente importantes. La gravedad de las consecuencias que origina sobrepasa incluso a las provocadas por otros factores bióticos y abióticos (Kramer, 1983). En consecuencia, el entendimiento de las respuestas moleculares de las plantas a diferentes tipos de estrés abiótico ha sido uno de las líneas prioritarias en la investigación agrícola con el fin de generar nuevas variedades de cultivos con una mejor eficiencia en el uso del agua (Cushman, 2001; Flower *et al.*, 2000).

De las respuestas a nivel celular y molecular que se manifiestan cuando una planta se encuentra en condiciones de sequía son por ejemplo, cambios morfológicos, ajuste en el transporte de iones y cambios metabólicos (Zhu, 2002). Por una parte se ha observado que las plantas responden a la mayoría de los tipos de estrés abióticos por cambios en las relaciones de agua, alteración en su crecimiento y por cambios en su balance de fitohormonas, frecuentemente produciendo más ácido abscísico (ABA) y a menudo citocininas. Si bien estos cambios son en parte los responsables de la reducción del crecimiento, también se han registrado cambios en el balance de carbono, un descenso en la asimilación de nutrientes y reducciones en la tasa fotosintética de las plantas (Chapin *et al.*, 1988).

Dentro de los mecanismos moleculares iniciales involucrados en la respuesta de las plantas a la sequía se han identificado genes que codifican proteínas involucradas en la percepción del déficit hídrico, cinasas y fosfolipasas involucradas en la transducción de señales (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Xiong y Zhu, 2002; Shinozaki *et al.*, 2003), proteínas involucradas en la regulación de los factores de transcripción y enzimas involucradas en la biosíntesis de lípidos (Shinozaki y Yamaguchi, 1997; Shinozaki *et al.*, 2003).

Un segundo grupo lo conforman los genes que codifican para proteínas de respuesta a estrés, entre las que se encuentran las chaperonas que ayudan a reestablecer la funcionalidad de aquellas que son afectadas por el estrés, proteínas LEA, acuaporinas que al formar canales membranales participan en el movimiento del agua, proteínas requeridas para la biosíntesis de varios osmoprotectores, los cuales se encuentran involucrados en el ajuste osmótico, así como en el incremento y mantenimiento de gradientes iónicos celulares, mecanismos que permiten el mantenimiento de la turgencia cuando disminuye el suministro de agua en la planta (Marshall y Drumbroff, 1999) y proteínas antioxidantes tales como ascorbato peroxidasa (AP), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT) (Ingram y Bartels, 1996; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Bohnert y Sheveleva, 1998).

Gran parte de la información generada sobre los mecanismos moleculares involucrados en el proceso de percepción-transducción respuesta bajo condiciones de déficit de agua ha sido a partir de plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* que no son naturalmente tolerantes a la sequía. El uso de plantas con una alta tolerancia natural a estrés abiótico puede abrir la posibilidad de un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares de la tolerancia al estrés hídrico de las plantas. Es por ello que nuestro grupo de investigación se interesó en estudiar a la planta *Bouteloua gracilis* [H.B.K.] Lag. ex Steud., un pasto forrajero importante, conocido como navajita azul, el cual es altamente tolerante a la sequía y es nativo de las zonas áridas de México y Estados Unidos de Norteamérica (Weaver y Clements, 1938; Hitchcock, 1950). Su área de distribución se caracteriza por climas desérticos, con temperaturas muy extremas (arriba de los 50°C al medio día y -6°C por la noche) y con precipitaciones anuales tan bajas como 254 mm (Aguado-Santacruz, 1997).

Con base en estos antecedentes se generó una genoteca sustractiva a partir de plantas de *B. gracilis* crecidas bajo condiciones de déficit hídrico, las cuales fueron regeneradas a partir de una línea celular clorofílica de esta especie (Aguado-Santacruz *et al.*, 2001). Los EST's (etiquetas de secuencias expresadas) aislados a partir de las plantas crecidas bajo condiciones de déficit hídrico fueron



secuenciados, identificados y clasificados con base en su posible función biológica. Se obtuvieron 47 unigenes, encontrando que 25 corresponden a secuencias de genes previamente reportados en las bases de datos del GenBank, mientras que los 22 restantes corresponden a secuencias no reportadas. Se analizó la expresión diferencial de algunos unigenes bajo diferentes condiciones de estrés abiótico mediante RT-PCR.

Materiales y Métodos

*Condiciones experimentales para la construcción de la Genoteca sustractiva (SSH) de plantas isogénicas de *Bouteloua gracilis* crecidas bajo condiciones de sequía*

Plantas de *Bouteloua gracilis* regeneradas a partir de las células clorofílicas 'TIANSJ98' (Aguado-Santacruz *et al.*, 2001) fueron disectadas en grupos de cinco hijuelos, transplantadas en cuatro macetas de 7 L de capacidad conteniendo una mezcla de suelo limoso y arena (1:1) y mantenidas bajo condiciones de riego durante dos meses. Al término de este periodo, se suspendió el riego a 2 plantas (muestra problema) y mediante un voltímetro de punto de rocío (modelo HT-33T; Wescor, Inc.; Logan, Utah) y cámaras psicrométricas (modelo C-52-SF; Wescor, Inc.; Logan, Utah) se llevó a cabo un seguimiento de los potenciales hídricos de las plantas a fin de establecer el momento en el cual las plantas sometidas a sequía alcanzaron un potencial hídrico en las hojas de aproximadamente -2.0 MegaPascales (MPa), mientras que a otras 2 plantas (muestra control) se les siguió aplicando el riego. Posteriormente, se colectó y congeló el material vegetal para la extracción de RNA mensajero. Las condiciones ambientales del invernadero en el cual se crecieron las plantas fueron a una temperatura ambiental promedio de 34°C, mínima de 18°C y una máxima de 44°C; así como una humedad relativa promedio del 65%.

Aislamiento de RNA total y mensajero

El RNA total fue extraído mediante el kit 'Concert' de Invitrogen (Carlsbad, California) a partir de hojas de plantas completas regeneradas de las células clorofílicas. El RNA mensajero se aisló y purificó mediante el kit de esferas magnéticas 'Dynabeads' (Dyna, Oslo, Norway). La calidad del RNA mensajero extraído se evaluó en geles de agarosa desnaturizante al 1%.

Construcción de la SSH

La construcción de la biblioteca sustractiva de cDNA se realizó utilizando el kit de Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction, a partir de plantas isogénicas crecidas bajo condiciones de déficit hídrico. El cDNA 'control' se obtuvo a partir de plantas

de *Bouteloua gracilis* crecidas bajo condiciones de riego ($\Psi_w = -0.5$ MPa), mientras que el cDNA 'problema' se obtuvo de plantas crecidas bajo condiciones de estrés por sequía ($\Psi_w = -2.0$ MPa). Los cDNA's fueron digeridos con la enzima de restricción RsaI. La población de cDNA "problema" fue dividida en dos porciones y cada una de ellas ligada con un adaptador diferente. Las dos poblaciones de cDNA problema se mezclaron cada una por separado con un exceso de cDNA control. Las dos mezclas resultantes de estas primeras hibridaciones se combinaron y se alinearon con el cDNA de la condición control. Posteriormente, se llevaron a cabo dos rondas de PCR para amplificar los cDNA's resultado de la expresión genética diferencial bajo la condición de estrés hídrico. Las poblaciones de cDNA's substraídos fueron clonados en el vector pCR 2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA), el cual fue utilizado posteriormente para la transformación de células electrocompetentes de *Escherichia coli* DH5 α (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Secuenciación y análisis bioinformático de los EST's diferenciales

Las clonas seleccionadas fueron crecidas en medio LB líquido con ampicilina 100 mg/L y crecidas por 12 horas a 37°C, a 250 rpm. El aislamiento y purificación del DNA plasmídico se realizó con el Kit Quiaprep MiniSpin (QUIAGEN). La secuenciación se llevó a cabo por el método de Sanger en el laboratorio de Genómica del Centro de Investigaciones y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN), Unidad Irapuato. Las muestras fueron procesadas en un secuenciador automático ABI PRISM 310 Genetic analyzer (Perkin Elmer). El agrupamiento de secuencias para eliminar las redundancias se realizó con el software SeqMan de Lasergene (DNASTAR). Se realizaron comparaciones con las bases de genes empleando el algoritmo BLASTx y BLASTn de NCBI. Para la clasificación de los EST's diferenciales se utilizaron las bases de datos TIGR (<http://www.tigr.org>) y Gene ontology (<http://www.geneontology.org>).

Análisis de la expresión diferencial de los EST's mediante RT-PCR

Para el estudio de la expresión de genes en plantas de *Bouteloua gracilis* en condiciones de estrés hídrico se utilizó el Kit SuperScript II™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las recomendaciones del protocolo incluido en el kit. Se adicionó 1 µL de cDNA a cada reacción de PCR de 50 µL, empleando los primers específicos para amplificar el gen de actina como control interno de carga. Después de ensamblar y analizar las secuencias obtenidas en la genoteca substractiva se diseñaron primers específicos para *B. gracilis* mediante el programa PrimerSelect de Lasergene (DNASTar), estos primers fueron para los genes identificados en este estudio como fueron aquellos que codifican la enzima pirofosfatasa desplazadora de protones, un factor de ribosilación de ADP, el factor de splicing 3B, una proteína hipotética desconocida, la subunidad alfa del proteosoma, la chaperona ortóloga a DnaJ, una cisteín proteinasa, la proteína NFU y una ATPasa subunidad beta (Tabla 1). Todos los fragmentos amplificados correspondieron al tamaño esperado en base al diseño de los primers. Los niveles de expresión de los genes en cada muestra de *B. gracilis* fueron calculados con base a la intensidad de las bandas mediante el software de análisis 1-D Quantity One 4.5 (BIO-RAD, Hercules, CA.), llevándose a cabo un proceso de normalización a través de la expresión de un gen de actina. El programa para las condiciones de amplificación fueron: un ciclo inicial de 95°C por 5 min, seguido de 95°C por 30 s (desnaturalización), 60°C por 1 min (alineamiento), 72°C por 1.5 min (extensión), entre 25 ó 30 ciclos, dependiendo del transcrito analizado. Los productos amplificados fueron separados electroforéticamente en geles de agarosa al 1% con TAE 1X, teñidos con EtBr y fotodocumentados.

Análisis de la expresión de genes substractivos de Bouteloua gracilis con diferentes tratamientos de estrés abiótico

Con la finalidad de analizar la expresión de los genes de *B. gracilis* bajo diferentes estímulos, se emplearon hojas cortadas con un tamaño aproximado de 10 cm de longitud de *B. gracilis*, colocándolas directamente en los siguientes tratamientos:

1) Agua destilada (Control); 2) Polietilenglicol 8000 (PEG8000) al 20% (estrés osmótico); 3) PEG8000-20%-4°C (estrés osmótico y por frío); 4) PEG8000-20%-40°C (estrés osmótico y por calor); 5) 250 mM KCl (estrés osmótico y salino); 6) 400 mM NaCl-4°C (estrés salino y por frío); 7) 400 mM NaCl-40°C (estrés salino y por calor); 8) una mezcla de poliaminas 1 μ M de putrescina, espermina y espermidina; 9) 75 mM NaCl (estrés salino), 10) 400 mM NaCl (estrés salino); 11) 4°C (estrés por frío); 12) 40°C (estrés por calor); 13) 10 μ M ABA (para identificar a los genes que se expresan por esta ruta); 14) 100 μ M ABA; 15) 400 mM NaCl-100 μ M ABA-4°C (combinación de algunos tratamientos) y 16) 400 mM NaCl-100 μ M ABA-40°C. Todos los tratamientos se aplicaron por un periodo de 6 h. Los experimentos que no incluyeron tratamientos de frío o calor, se mantuvieron a 25°C.

Resultados y Discusión

*Establecimiento de condiciones de estrés hídrico de *Bouteloua gracilis* para el desarrollo de la Genoteca Sustractiva (SSH)*

A fin de establecer los niveles de tolerancia de *B. gracilis* a diferentes niveles de estrés hídrico y posteriormente definir los puntos para la colecta de material para la construcción de la genoteca substractiva se realizaron mediciones de potencial hídrico en plantas en invernadero, determinándose el Punto de Marchites Foliar (PMF) y el Punto de Marchites Permanente (PMP) de las plantas bajo déficit hídrico. Se observó a un potencial hídrico de -3.5 MPa (84 días de tratamiento) que las hojas se enrollaban y se empezaban a tornar amarillentas (datos no mostrados). Se determinó que el PMF oscila entre los -4.0 y -5.0 MPa (90 a 100 días de tratamiento) y el PMP se encuentra a un potencial hídrico de -7.0 MPa, sobreviviendo la planta hasta 120 días sin riego (Fig. 1). En base a estas determinaciones elegimos un potencial hídrico de -2.0 MPa, el cual se desarrolló en las plantas aproximadamente a los 60 de la suspensión del riego. De esta manera, consideramos que un $\Psi_w = -2.0$ MPa sería un nivel adecuado para obtener genes que se estén expresando en un etapa inicial-intermedia del estrés hídrico en *B. gracilis*. Además, se tomó como antecedente que nuestro grupo de investigación reportó previamente, que una línea celular denominada 'TADH-XO' derivada de la línea celular 'TIANJ98' (línea de la cual se regeneraron las plantas para la creación de la SSH) de *B. gracilis* desarrolló niveles superiores de clorofila cuando se creció en presencia de 21% de polietilenglicol 8000 ($\Psi_w = -2.0$ MPa) que cuando se creció bajo condiciones normales ($\Psi_w = -0.5$ MPa) (García-Valenzuela *et. al.*, 2005). De esta manera, se pretende que al seleccionar el mismo punto para la construcción de la SSH en plantas, a futuro pueda permitir realizar un comparativo de la expresión génica de las respuestas al estrés hídrico tanto en células en suspensión como en planta completa.

*Identificación de los genes inducidos en la planta *Bouteloua gracilis* en condiciones de sequía.*

Con la finalidad de identificar genes de *Bouteloua gracilis* involucrados en la respuesta a sequía, se construyó una genoteca de cDNA por la técnica de Hibridación Sustractiva por Supresión (SSH). La substracción fue realizada utilizando cDNAs de hojas de plantas sometidas a un periodo de 60 días bajo déficit hídrico alcanzando un potencial hídrico de -2.0 MPa, condición problema, y como condición control plantas en riego.

Posteriormente, se clonaron los fragmentos amplificados de la SSH y se seleccionaron fragmentos de entre 200 a 1000 pb en un análisis por restricción de la endonucleasa *EcoRI*. Se secuenciaron un total de 131 clonas utilizando el primer Universal. El siguiente paso fue ensamblar las secuencias utilizando el software SeqMan de Lasergene (DNASTar) obteniendo un total de 55 agrupamientos “contigs”. De los cuales 25 “contigs” fueron secuencias únicas y 30 “contigs” fueron formados por varias secuencias.

Posteriormente, estos agrupamientos se analizaron utilizando como herramienta el programa BLASTx y BLASTn del GenBank, donde se observó que algunos agrupamientos conformaban parte del mismo gen, obteniéndose un total de 47 unigenes, de los cuales 25 ya han sido reportados y 22 no están registrados en el GenBank (Tabla 2).

Clasificación de las secuencias de acuerdo a su posible función.

Para determinar la función potencial y clasificar los 47 unigenes obtenidos se utilizó el programa Geneontology (www.geneontology.org). De acuerdo a los resultados del análisis, los 47 unigenes fueron asignados dentro de 8 categorías funcionales en base a su función molecular, incluyendo una clasificación para las proteínas de función desconocida y secuencias que no presentaron homología alguna con las secuencias reportadas en el GenBank (Fig. 2). Este estudio reveló que las secuencias obtenidas presentan una gran homología principalmente a arroz (*Oryza sativa*), maíz (*Zea mays*) y *Arabidopsis thaliana*.

Dentro de las clasificaciones formadas, en la categoría del proceso de la fotosíntesis se ubica el gen que codifica para la proteína NFU, que participa en la biogénesis de los cluster Fe-S, siendo esta muy importante en el proceso de fotosíntesis, en la asimilación de nitrógeno y azufre, procesamiento de clorofila y en la respiración mitocondrial (Léon, 2003; Ye *et al*, 2006). En señalización, se clasificó a un gen que codifica para una proteína MYB, que presenta dominios de unión al DNA. Estas proteínas se han encontrado en todos los eucariontes, pero son particularmente encontradas con mayor frecuencia en plantas (en *Arabidopsis* se han identificado más de 200). Muchas de ellas están implicadas en vías de desarrollo y metabolismo de plantas, diferenciación celular y de órganos y en respuestas a los estímulos ambientales (Petroni, 2002). Dentro de la clasificación de proteínas relacionadas con el estrés, se ubicó a una chaperona ortóloga a la DnaJ, la cual ya fue reportada anteriormente para el estrés por calor, encontrada primeramente en *E. coli* y posteriormente en plantas (Zhu, 1993).

En la clasificación de proteínas involucradas en el metabolismo, se ubicó la enzima metil-transferasa, la cual cataliza la transferencia de grupos metilos de la S-adenosilmetionina a los residuos anormales de L-isoaspartil y de D-aspartil en una gran variedad de péptidos y proteínas que se distribuyen extensamente en procariontes y eucariontes. Estas enzimas participan en la reparación del daño espontáneo de proteínas facilitando la conversión de los residuos de L-isoaspartil y de D-aspartil a los residuos normales de L-aspartil (Mudgett y Clarke, 1996). En el grupo de proteínas relacionadas con transporte, se identificó a una proteína TIC20, la cual se encuentra localizada en cloroplasto. Se sabe que esta familia de proteínas están involucradas en el transporte de proteínas al interior del cloroplasto (Chen, 2002). Dentro de la clasificación de proteínas relacionadas con la síntesis de proteínas, se encuentra la proteína ribosomal L10a, la cual es una proteína estructural del ribosoma involucrada en la traducción de proteínas (McIntosh y Bonham-Smith, 2005; Olvera y Wool, 1996). Las clasificaciones y porcentajes se muestran en la Figura 2.

Análisis de la expresión de genes de Bouteloua gracilis a -2.0 MPa.

Para confirmar la expresión diferencial de los transcritos aislados, se analizó un grupo de genes al azar, utilizando las mismas muestras de plantas obtenidas para la SSH. De los 47 unigenes, seleccionamos al azar 9 unigenes para examinar la acumulación de estos transcritos mediante experimentos de RT-PCR. Por lo menos dos experimentos independientes fueron utilizados para realizar los estudios de expresión génica. Las condiciones de las reacciones de PCR fueron optimizadas para no producir una saturación en la acumulación de los productos de PCR, manteniendo una relación lineal con los niveles originales del transcrito en todas las muestras.

Para todos los genes analizados, las intensidades de las señales fueron cuantificadas y los valores obtenidos fueron normalizados con el gen constitutivo que codifica para una actina (Fig. 3-5), utilizando un número estándar de ciclos de PCR (entre 25 y 30, dependiendo de cada gen; datos no mostrados). Todos los unigenes analizados mostraron un incremento en la condición problema (déficit hídrico) en comparación a la condición control (riego), sin embargo este aumento no fue muy alto, con valores relativos de intensidad de RNA mensajero de 0.3 a 0.8 veces (Fig. 3).

Análisis de la expresión de los genes de la planta Bouteloua gracilis bajo diferentes tratamientos.

Para elucidar si los genes inducidos aislados en la SSH (en condiciones de déficit hídrico) se regulan bajo diferentes condiciones de estrés abiótico, se plantearon diferentes experimentos utilizando hojas cortadas *B. gracilis*. Se aplicaron diversos tratamientos, como el uso de Polietilenglicol y el KCl para inducir un estrés osmótico, NaCl para estrés salino (75 y 400 mM), temperaturas extremas para inducir estrés por frío y calor (4 y 40°C), aplicación de hormonas como ABA (10 y 100 µM), una mezcla de poliaminas 1 µM (Putrescina, espermidina y espermina) y por último una combinación de algunos de los tratamientos de NaCl-ABA-4°C y NaCl-ABA-40°C.

Los 9 unigenes analizados en este trabajo mostraron patrones diferenciales de expresión genética característicos:

Unigen 6 (Pirofosfata traslocadora de protones)

Dos tipos de proteínas pirofosfatasas que hidrolizan el pirofosfato inorgánico (PPi), muy diferentes en secuencia y estructura de aminoácidos, se han caracterizado hasta la fecha, una localizada en citoplasma y otra unida a membrana encargada de bombear protones. Esta proteína ya ha sido involucrada previamente en diferentes tipos de estrés abiótico, como factores que causan un estrés osmótico en la planta, en especial el estrés salino (Maeshima, 2000). El aumento en los niveles de NaCl en el medio lleva consigo un incremento en el flujo de Na⁺ a las raíces y su distribución por toda la planta. Se sabe también, que el ingreso sin control de iones Na⁺ ocurre como resultado de la generación de un gradiente electroquímico muy elevado entre ambos lados de la membrana celular de las raíces. Los iones Na⁺ ingresan al interior del citoplasma gracias a la presencia de canales y transportadores catiónicos en la membrana plasmática, los cuales son inespecíficos frente al incremento de la proporción Na⁺/K⁺ en el medio.

La disminución en el contenido de iones K⁺ en el citoplasma trae como consecuencia una desestabilización en el potencial de membrana, la inactivación de enzimas y un efecto perjudicial sobre una serie de procesos fisiológicos. El restablecimiento de la homeostasis iónica, no es un problema de fácil solución para las plantas, ya que carecen de transportadores de sodio, tales como las Na⁺-ATPasas o las Na⁺/K⁺-ATPasas, por lo que deben recurrir a las H⁺-ATPasas o H⁺-pirofosfatasas para generar un gradiente electroquímico de protones que permitan el intercambio de H⁺ por Na⁺ y también de otros iones y metabolitos (Maeshima, 2000; Blumwald, 2000).

En reportes recientes se ha logrado aumentar la tolerancia a estrés abiótico en plantas transgénicas de tomate, canola y *Arabidopsis thaliana*, con la sobreexpresión del gen AVP1, el cual codifica para H⁺-pirofosfata (Apse, 1999; Palma, 2000; Zhang, 2001). En estas plantas, el sodio es acumulado en hojas,

observándose además que los frutos y las semillas no son afectados en su calidad.

En el análisis de la expresión diferencial de la H⁺-pirofosfatasa de *B. gracilis* presentó un aumento en su expresión genética en la mayoría de los tratamientos, siendo más evidente cuando se aplicó NaCl, 4°C, 40°C, KCl (Fig. 4 y 5).

Unigen 2 (Factor de ADP de ribosilación)

El unigen 2, que codifica para un factor de ADP ribosilación (ARF, por sus siglas en inglés), se ha descrito en la regulación del tráfico intracelular de vesículas, en la modificación y metabolismo de los lípidos de membranas, dinámica de los microtubulos, desarrollo, reclutamiento de proteínas y otros procesos celulares (Becerra, 2006). Este unigen presentó una inducción en su transcrito mayoritariamente en respuesta a los estímulos como PEG-4°C, NaCl, 4°C y 40°C. Previamente Sahi (2003) encontró en una genoteca substractiva de arroz que ARF se expresaba diferencialmente en respuesta a estrés salino.

Por otro lado, se ha observado que la sobreexpresión del gen ARF de arroz induce la resistencia a patógenos en plantas de tabaco, sugiriendo su participación en la resistencia sistémica por diferentes vías de transducción de señales (Lee, 2003). En este punto es importante mencionar que las respuestas de las plantas ante un determinado tipo de estrés no son específicas sino que pueden existir respuestas comunes a diferentes tipos de estrés. En otras palabras, las plantas han desarrollado una amplia gama de mecanismos para hacer frente tanto a estrés abióticos como bióticos (Orzech y Burke, 1998; Keller y Steffen, 1995; Cloutier y Andrews 1984). Hasta la fecha se han encontrado varias moléculas, incluyendo factores de transcripción y cinasas, que desempeñan funciones comunes entre las vías de señalización de los diferentes tipos de estrés en plantas. Las evidencias sugieren que los compuestos y fitohormonas que regulan las vías de señalización son el ácido abscísico, el ácido salicílico, el ácido jasmónico y el etileno, así como especies reactivas de oxígeno, jugando papeles dominantes entre el entrecruzamiento o “crosstalk” de las señalizaciones entre estrés biótico y abiótico (Fujita, 2006).

Unigen 3 (Factor de Splicing 3B subunidad 2)

El unigen 3, codifica para la subunidad 2 del factor de splicing 3B. Se observó que la mayor expresión de este gen ocurrió en los tratamientos con KCl, NaCl-4°C y 40°C, así como en el tratamiento de sal con ABA-4°C. Este factor junto con el factor de splicing 3A y la unidad RNA 12S, forman un complejo nuclear de riboproteínas llamado U2 (U2 snRNP) (Zhu y Brendel, 2003; Lorkovic *et al*, 2005). En cuanto a la expresión génica se sabe que este es un importante método de regulación post-transcripcional, incrementando la diversidad de proteínas y regulando el nivel de expresión de genes. Recientemente, el conocimiento sobre la maquinaria de splicing bajo condiciones de estrés en plantas ha tenido un gran auge, encontrándose en *Arabidopsis* más de 2000 predicciones de “splicing” alternativo. Se espera que este proceso de splicing pueda ser importante como un mecanismo de tolerancia a estrés en plantas (Bing, 2005).

Unigen 23 (Cisteín proteinasa)

La posible cisteín proteinasa que corresponde al unigen 23, ha sido estudiada en plantas, encontrándose que desempeña papeles esenciales en una variedad de procesos fisiológicos y del desarrollo, como la senescencia y la muerte celular programada (Ho *et al*, 2000). En arroz, se conoce que es responsable de la digestión de proteínas almacenadas en la semilla, para proporcionar los nutrientes y ayudar así al crecimiento planta (Ho *et al*, 2000). Se ha encontrado también que bajo condiciones de estrés por nutrientes, tiene una participación en la degradación de proteínas, acelerando y manteniendo la fuente de aminoácidos (Dice, 1987). En capas de aleurona en plantas de arroz y cebada, se ha observado que la expresión de genes que codifican para cisteín proteinasas es inducida por ácido giberélico y en presencia de ABA es suprimida (Koehler y Ho, 1990b; Shintani *et al*, 1997; Mikkonen *et al*, 1996) En nuestros resultados, este transcrito mantiene constante su expresión respecto al control (agua destilada) en la presencia de ABA. Las inducciones más sobresalientes fueron con las aplicaciones a 4°C y con NaCl en las dos temperaturas (4 y 40 °C), y en menor grado con PEG-4°C y NaCl-ABA-40°C (Fig. 4 y 5).

Unigen 24 (Proteína NFU)

En plantas, las proteínas NFU están involucradas en la biogénesis de los clusters Fe-S que se requieren para procesos esenciales como fotosíntesis o la respiración y están presentes en diversos compartimentos celulares. El análisis de secuencias del genoma del *Arabidopsis thaliana* reveló la existencia de varios genes que codifican proteínas similares a las encontradas en levadura y a proteínas bacterianas, que se sabe están implicadas en la biogénesis de los clusters de Fe-S.

En *A. thaliana*, se ha caracterizado la familia de genes NFU, clasificándolas en mitocondriales y de plástidos con características específicas (Léon, 2003). Por el contrario, existe poca información sobre la biogénesis del clusters de Fe-S en plantas. Se sabe también que los plástidos de plantas producen sus propios clusters de Fe-S y que están implicados en vías metabólicas esenciales, tales como la fotosíntesis, asimilación de nitrógeno y de sulfuros, importación de proteínas y procesamiento de la clorofila. La maquinaria biosintética de Fe-S de plástidos contiene muchos homólogos de la movilización bacteriana de las proteínas de sulfuro (SUF), pero hay componentes y características adicionales que pueden ser específicos de plantas. Estas características adicionales podrían hacer a la maquinaria del plástido y la participación de las proteínas NFU más eficiente en el ensamblaje de los cluster de Fe-S en presencia de oxígeno y posiblemente permitiendo la regulación de respuestas a estrés oxidativo, al estado de hierro y a la luz (Ye y Pilon-Smits, 2006). En nuestros resultados observamos que los tratamientos con sal, frío y calor inducen mayoritariamente la expresión del transcrito.

Unigen 21 (Subunidad alfa tipo 2 del proteosoma)

El unigen 21 codifica para la subunidad alfa tipo 2 del proteosoma. Se sabe que cuando las plantas se ven afectadas por algún tipo de estrés se pueden desencadenar mecanismos para la degradación de proteínas. La degradación de proteínas es un importante mecanismo de regulación en los procesos celulares, originando además un reservorio de aminoácidos. El equilibrio entre la síntesis y la

degradación de una proteína, juega un importante papel en el desarrollo. La existencia de sistemas o estructuras específicas para que este proceso tenga lugar, demuestra que la degradación de proteínas constituye una función tan importante en la célula como lo es su síntesis. Además de los organelos especializados en la degradación de proteínas, como son los lisosomas o las vacuolas en plantas, existe el proteosoma implicado en la degradación de proteínas específicas dentro de la célula (Rechsteiner *et al.*, 1993). En las células vegetales, que en general poseen tasas de división menores a la de otros organismos eucarióticos, la degradación controlada de proteínas por el proteosoma juega un importante papel en la regulación de la actividad genética. En una célula eucariótica se calcula que más del 90% de las proteínas de vida corta son degradadas por este sistema (Lam, 1996). Cuando una planta se encuentra en algún tipo de estrés abiótico algunas proteínas pueden sufrir daños en su estructura, dando como consecuencia un mal funcionamiento. En estas situaciones dicho complejo es el encargado de degradar a las proteínas que han sido afectadas por el estrés y que ya no pueden ser reparadas por algún tipo de chaperona. En reportes previos se ha observado que el proteosoma también tiene una participación en el mecanismo de regulación de rutas hormonales en plantas (Lorenzo y Solano, 2005).

Respecto a este gen, observamos que su expresión se ve aumentada en los tratamientos de las dos concentraciones de NaCl (75 y 400mM), 4°C, ABA (100uM) y las combinaciones NaCl-40°C y NaCl-ABA-4°C.

Unigen 8 (Proteína chaperona ortóloga a DnaJ)

El unigen 8 codifica para una proteína de choque térmico denominada DnaJ. El estrés abiótico normalmente provoca daño a proteínas. Las chaperonas son responsables del plegamiento, ensamblaje, translocación y degradación en muchos procesos celulares normales, estabilizando proteínas y membranas, y puede ayudar a replegar la proteína bajo condiciones de estrés (Wang, 2004). Los resultados obtenidos para este unigen mostraron que a las 6 h, existe una ligera inducción del transcrito en estrés por calor (40°C), sin embargo en otros

tratamientos se observó una mayor inducción en condiciones de estrés osmótico causados por PEG y KCl, en la combinación de PEG-NaCl-4°C y NaCl-ABA-4°C. Recientemente se reportó que el gen DnaJ de chile, aumenta su transcrito en estrés por frío y por sal a las 6 h (Hwang et al., 2005). En otro análisis de expresión diferencial en hojas de tabaco bajo condiciones de estrés oxidativo, se observó inducción diferencial de esta chaperona (Vranová, 2002). Por otro lado, en el tratamiento con una mezcla de poliaminas, se observó una notoria inducción del transcrito de la DnaJ. En un trabajo en células de tabaco, se observó que existe una correlación entre la biosíntesis de poliaminas y la síntesis de proteínas de choque térmico durante condiciones de estrés por calor (Königshofer y Lechner, 2002).

Unigen 25 (ATPasa subunidad beta)

La ATPasa es un complejo enzimático ampliamente distribuido en la naturaleza que se localiza en la membrana plasmática, la membrana tilacoidal de los cloroplastos y en la membrana interna de las mitocondrias (Domínguez-Ramírez y Gómez- Puyou, 2005).

Las plantas se valen de la ATPasa para regular los gradientes de protones evitando el incremento de iones. Muchas plantas, tienen una menor capacidad para el transporte de Na⁺, la eliminación de Na⁺/K⁺ y la compartimentalización de Na⁺, dando como resultado una susceptibilidad relativamente alta al estrés salino y sequía. Las ATPasas se han estudiado y caracterizado en plantas de la resurrección como *Turtula ruralis* observándose que la actividad de las ATP sintasas juegan un papel fundamental en la tolerancia a la desecación y al estrés salino de las plantas (Chen, 2002). En nuestros resultados observamos que principalmente la inducción es por frío, así como en la combinación de PEG a 4°C, NaCl a 4°C, 40°C, NaCl-ABA a 4°C.

Conclusiones

En los resultados obtenidos del análisis de la expresión diferencial de los genes de *Bouteloua gracilis*, observamos que la mayoría de los genes responden a los diferentes estímulos a los cuales fueron sometidas las hojas. Sin embargo se observó que la mayoría de estos genes de *B. gracilis* tuvieron un incremento bastante considerable en los estímulos por salinidad y frío.

Aun cuando estos genes fueron obtenidos bajo condiciones de déficit hídrico, no son exclusivos de respuesta a este tipo de estrés. Puesto que se sabe que la tolerancia o susceptibilidad al estrés abiótico es un problema multifactorial y por lo tanto de difícil solución, en parte porque el estrés puede ocurrir en múltiples etapas del desarrollo de la planta y a menudo más de un estrés afecta simultáneamente a la planta. Por lo que, esta investigación sienta las primeras bases moleculares de las respuestas de *B. gracilis* en diferentes tipos de estrés abiótico. Sin embargo es necesario realizar más estudios para obtener un entendimiento mas claro de las respuestas moleculares de la respuesta a estrés abiótico de *B. gracilis*. Estos estudios pueden involucrar al grupo de secuencias desconocidas, puesto que podrían ser genes nuevos involucrados en la tolerancia a factores ambientales adversos.

Figuras

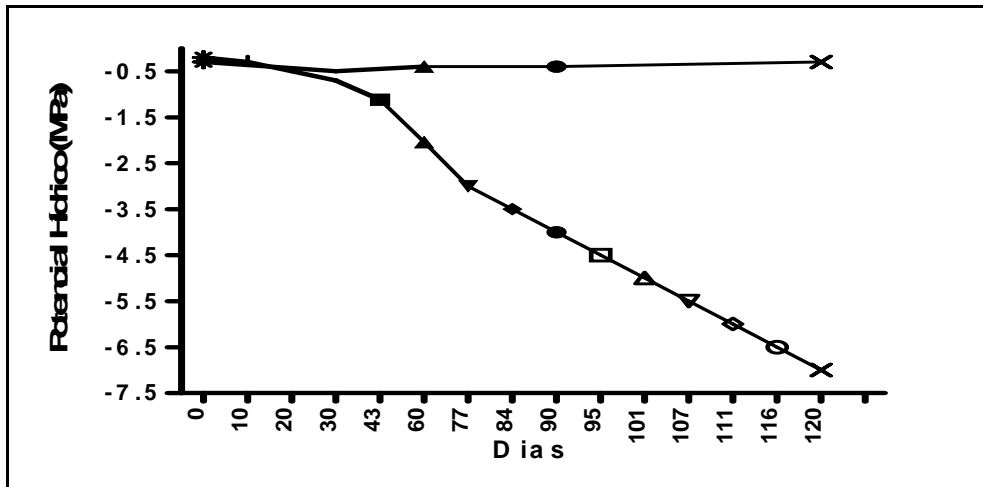


Figura 1. Grafica donde se indica la determinación del potencial hídrico de *Bouteloua gracilis* por un periodo de tiempo de 120 días en invernadero. Cada valor es el promedio de 3 plantas por cada día de medición.

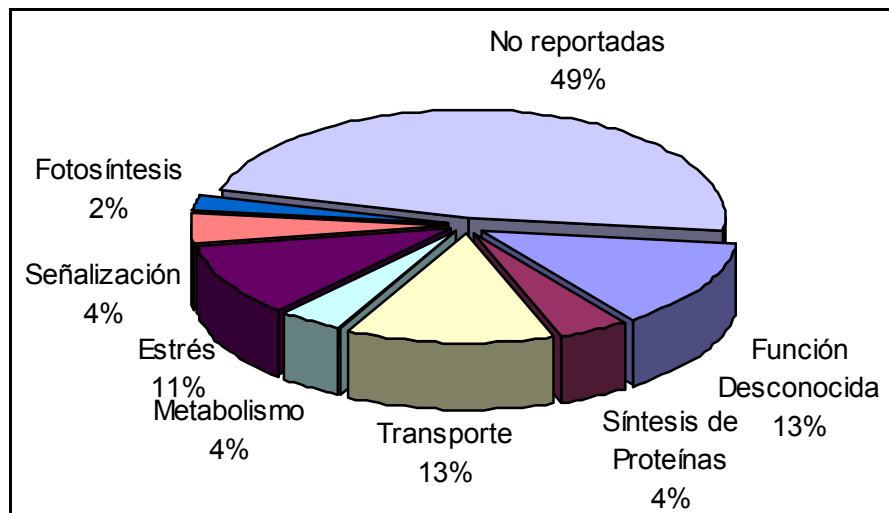


Figura 2. Grafica de pastel obtenida de la clasificación de genes de acuerdo a su posible función celular.

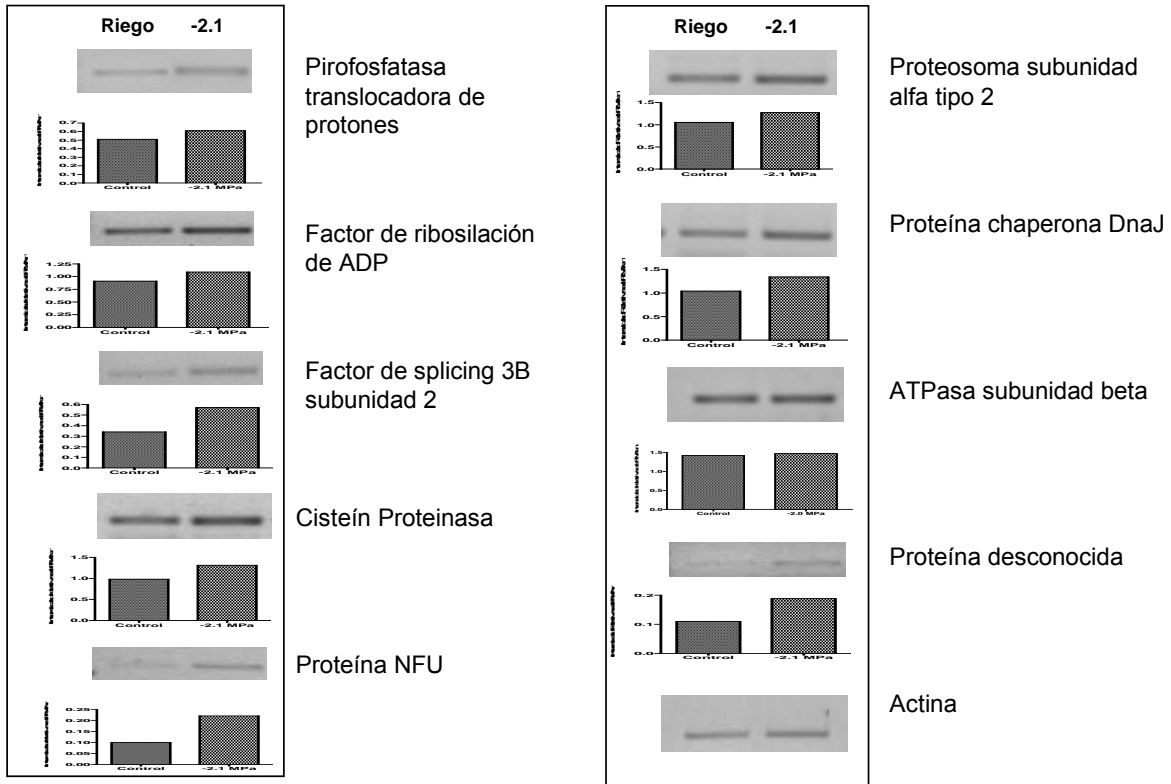


Figura 3. Análisis de expresión diferencial de nueve genes en condiciones de riego y sequía (-2.0 MPa). Se emplearon 5 μ g de RNA total para los análisis de RT-PCR. Se separaron electroforéticamente 10 μ L de cada producto de PCR, en un gel de agarosa al 1%. Como control de carga se empleó el gen de actina.

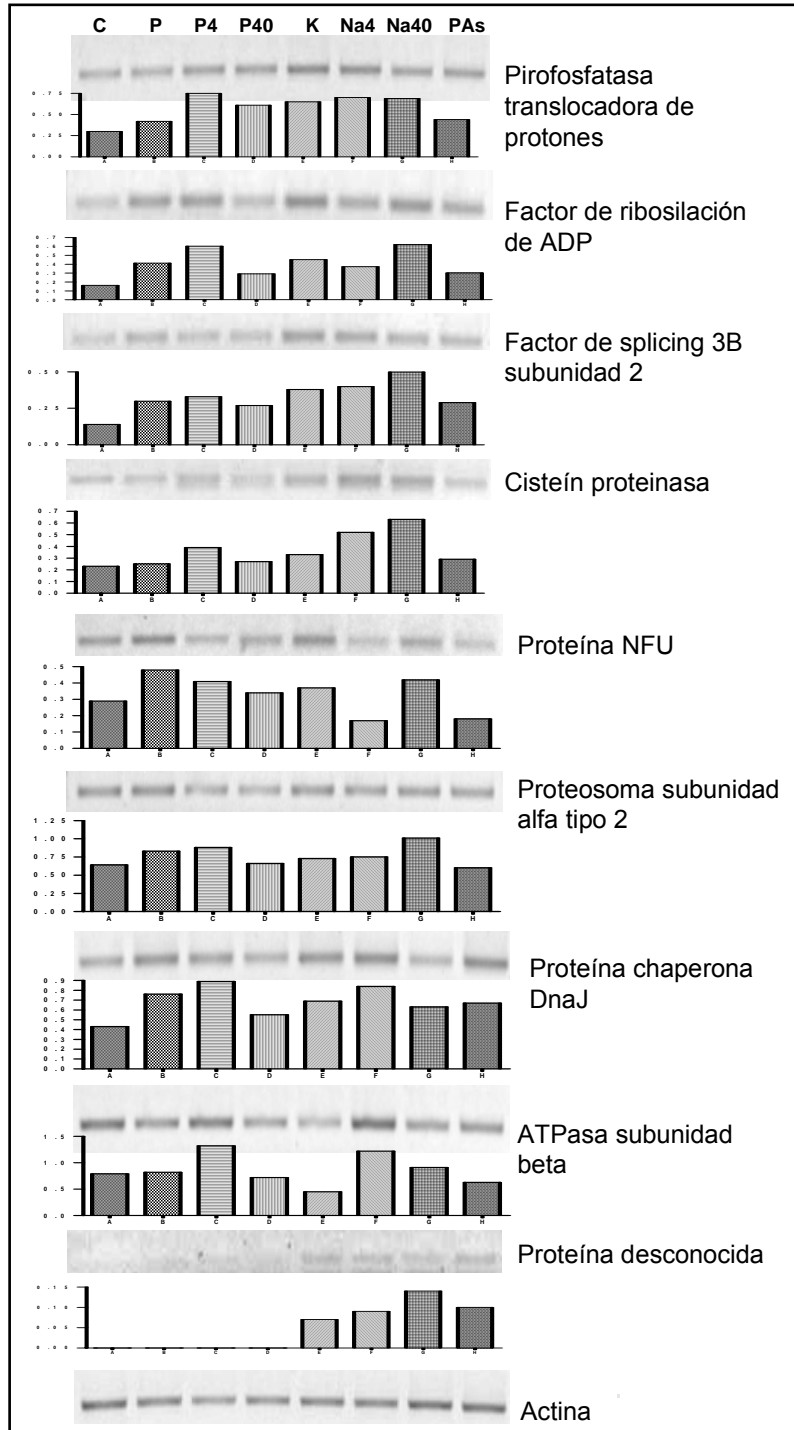


Figura 4. Expresión diferencial de EST's en hojas de *Bouteloua gracilis* en respuesta a estímulos externos durante 6 horas en agua destilada (C), PEG8000-20% (P), PEG8000-20% a 4°C (P4), PEG8000-20% a 40°C (P40), 250 mM KCl (K), 400 mM NaCl a 4°C (Na4), 400 mM NaCl a 40°C (Na40) y 1 μ M de Putrescina, Espermina y Espermidina (PAs). Como control de carga se empleó el gen de actina. Todos los tratamientos fueron mantenidos a 25°C excepto los tratamientos de frío a 4°C y calor a 40°C.

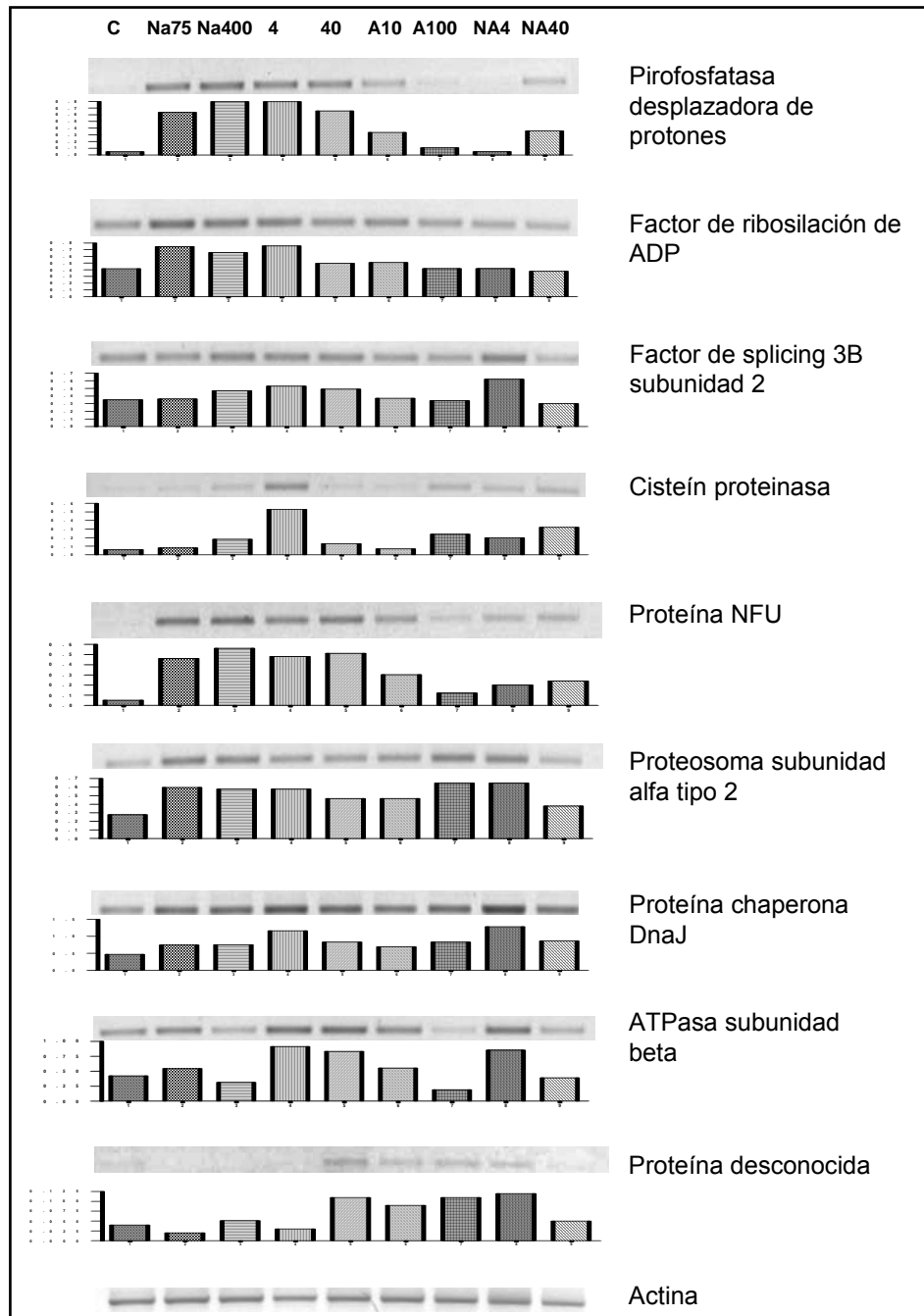


Figura 5. Expresión diferencial de EST's en hojas de *Bouteloua gracilis* en respuesta a estímulos externos durante 6 horas en agua destilada (C), 75 mM NaCl (Na75), 400 mM NaCl (Na400), 4°C (4), 40°C (40), 10 μ M ABA (A10), 100 μ M ABA (A100), 400 mM NaCl-100 μ M ABA-4°C (NA4) y 400 mM NaCl-100 μ M ABA-40°C (NA40). Como control de carga se empleó el gen de actina. Todos los tratamientos fueron mantenidos a 25°C excepto los tratamientos de frío a 4°C y calor a 40°C.

Tablas

Tabla 1. Secuencias de los oligonucleótidos empleados para los experimentos de RT-PCR.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
C7F	CGAGGTACATTGAGGCTGGT
C7R	TGCCTCATGGAGGCTAAGAG
C15F	GATTGTATGAAGGTCTGGACTG
C15R	AACCTTCACCAAAGCTCAATAAC
C16F	CAGGTACCAAGAAGCGCGA
C16R	CTAGCCAAACTTCATCTAAACTTGAA
C4F	AATTCCGTTACTGCCCGTAATGAA
C4R	AATTCACAATCTCCTGTTCCCTCTC
C8F	AAGTTGGCGCAGATCGAGCA
C8R	GGTATAGTTTCCTTGTAAGCCG
C36F	GCAGTTGGTGTAAATCTCGGCA
C36R	ATCATGCTCGCTGGCCATC
C14F	CCACTGTGGATCATGCTGGA
C14R	GCGAACCAGACCAACAGCAT
C53F	GACCATGTTTCATCCAGACACAG
C53R	CTATCCCAGACTTCAATGTGACTG
ATPSynF	GGCATTCTACCCAATAAGGC
ATPSynR	CGTCTCCTATTCATAGATCTGC
Actina1F	AACTGGGATGACATGGAGAA
Actina1R	ATCACACTTCATGATGGAGTTGTA

Tabla 2. Clasificación de las secuencias de cDNA aisladas en la SSH.

Unigen	Contig (EST's) y secuencias únicas	N° de acceso (NCBI)	Anotación	GO	Valor E
1	1(1f8, 1f9, 1c2)	TC270233	AT3g11830/F26K24_12 [Arabidopsis thaliana]	Función Desconocida	1.2e-40
2	2(3d2, 3c7, 3d1, 3c12, 3b7)	TC259524	ADP-ribosylation factor [Oryza sativa]	Transporte	4.1e-31
3	3(1e3, 1e5, 1b5) 4(1g8, 1d1) (1c10)	BAD23055.1	Splicing factor 3B subunit 2 [Oryza sativa]	Transcripción	5e-05
4	3a9	TC269318	Histone H2A [Zea mays]	Función Desconocida	1.3e-14
5	5(2c4, 2e4, 2d8)	TC260253	Major facilitator superfamily antiporter [Oryza sativa]	Transporte	1.7e-7
6	6(1b1, 1f2)	CAF18416.1	Proton translocating pyrophosphatase [Oryza sativa]	Transporte	2e-32
7	7(1a6, 1a7, 1a5) 8(2a1, 1a8) 9(2e9, 2a2, 1a1, 1a12)	TC313288	Protein carboxyl methylase [Arabidopsis thaliana]	Metabolismo	1.4e-24
8	10(3h4, 3c11) (3a12)	BAD27799.1	Chaperone protein dnaJ [Oryza sativa]	Estrés	3e-30
9	3g5, 3h8	CD441795	NBS-LRR-like resistance protein [Oryza sativa]	Estrés biótico	6.9e-10
10	3c2	AI664980	Glycine rich RNA binding protein [Oryza sativa]	Estrés por Frio	0.18
11	11(2a10, 2a12, 3f11, 2b1, 2c2, 2b2, 2a11, 3d3, 2a7, 3d4, 3d11) 12(1d12, 3f5, 3f4, 3f3)	BC013128.1	CCAAT/enhancer binding protein [Homo sapiens]	Señalización	0.0
12	13(1c3, 2b10, 2d6, 2d5, 1a3)	BAD27894	Unknown protein [Oryza sativa]	Función desconocida	2e-36
13	3b4	BAD23762.1	Hypothetical protein [Oryza sativa]	Función desconocida	0.39
14	3b2	BAD46475.1	Hypothetical protein [Oryza sativa]	Función desconocida	4e-25
15	14(1c1, 2f7)	AW424700	Hypothetical protein [Caenorhabditis elegans]	Función desconocida	3e-6
16	15(1b3, 3b10) (1b4)	TC263449	IN2-2 protein [Zea mays]	Estrés por Herbicida	5.1e-07
17	16(2c5, 2a9, 1h11, 1h8, 1h10, 1g5)	TC263915	Putative Myb-like DNA-binding protein [Zea mays]	Señalización	2.7e-12
18	17(1b11, 1e2, 3d12)	BAC83204.1	Putative Tic20 protein [Oryza sativa]	Transporte	7e-09
19	18(1g1, 1f12, 3e2)	BAD09090.1	Putative ribosomal protein L10a [Oryza sativa]	Síntesis de proteínas	1e-37
20	19(3g11, 3g10)	TC248638	40S ribosomal protein S21 [Oryza sativa]	Síntesis de proteínas	5.3e-10
21	20(1c12, 1d2, 3f6, 3a11)	AAT78811.1	Proteasome subunit alpha type 2 [Oryza sativa]	Metabolismo	8e-59
22	21(1d4, 1g12, 1f3, 1b8, 1f5, 1f4)	TC270037	Seed imbibition protein Sip1 [Hordeum vulgare]	Transporte	3.4e-9
23	22(3e12, 1d9, 1e11, 3e1, 1h10)	BAA08245.1	Cysteine proteinase [Zea mays]	Estrés por Frío y abiótico	6e-73
24	23(3h11, 2d9, 2d8)	CAD55561.1	NFU protein [Arabidopsis thaliana]	Fotosíntesis	8e-92
25	1a69	CAA43610.1	ATPase subunit beta [Nicotiana sp.]	Transporte	3e-132
26(1e8, 2c10); 27(2d9, 2e7); 28(1c4, 2d7, 1a4, 1d7); 29(3h6, 2c11, 2d2, 1f7); 30(2e6, 2a8); 31(1c7, 1b6); 2b6; 3e12; 2a3; 1a10; 1d5; 2f9; 2b3; 1h4; 3f7; 3b8; 2a4; 3e11; 3g8; 1g2; 3c6; 3e7			No reportadas		

Referencias:

- Aguado-Santacruz, G.A. (1997). Efectos del T-DNA de *Agrobacterium rhizogenes* sobre la estructura y fisiología de la gramínea forrajera *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag ex Steud. Examen Predoctoral 1:5
- Aguado-Santacruz, G.A., Cabrera-Ponce, J.L., Olalde-Portugal, V., Sánchez-González, M.R. y Herrera-Estrella, L. (2001). Tissue culture and plant regeneration of blue grama grass. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 67: 45.
- Aguado-Santacruz, G.A., Cabrera-Ponce, J.L., Ramírez-Chávez, E., León-Ramírez, C.G., Herrera-Estrella, L. y Olalde-Portugal, V. (2001). Establishment, characterization and regeneration from highly chlorophyllous embryogenic cell cultures of blue grama grass. *Plant Cell Reports.* 36: 328.
- Aguado-Santacruz, G.A., Rascón-Cruz, Q., Cabrera-Ponce, J.L., Martínez-Hernández, A., Olalde-Portugal, V. y Herrera-Estrella, L. (2002). Transgenic plants of blue grama grass, *Bouteloua gracilis* (H.B.K.) Lag. Ex Steud from microprojectile bombardment of highly chlorophyllous embryogenic cells. *Theor Appl Genet.* 104: 763.
- Apse, M.P., Aharon, G.S., Snedden, W.A. y Blumwald, E. (1999). Overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport confers salt tolerance in *Arabidopsis*. *Science* 285:1256-1258.
- Becerra B. C.M. del C. (2006). Genes implicados en el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis thaliana* (L.): caracterización de los genes *AtAnkTm*. Tesis Doctoral de la Universidad de Barcelona.
- Bing, B.W. (2005). Genome-wide analysis of splicing related genes and alternative splicing in plants. Tesis Doctoral. Iowa State University, Ames, Iowa.
- Blumwald, E., Aharon, G.S. y Apse, P. (2000). Na⁺ transport in plant cells. *Biochimica Biophysica Acta* 1465:140-151.
- Bohnert H.J. y Sheveleva E. (1998). Plant stress adaptation: making metabolism move. *Curr Opin Plant Biol* 1: 267-274.
- Chapin III, F.S., Fetcher, N., Kielland, K., Everett, K. R., Linkins A.E. (1988). Productivity and nutrient cycling of Alaskan tundra: enhancement by flowing soil water *Ecology* 69:693-702.
- Chen, X., Kanokporn, T., Zeng, Q., Wilkins, T.A., Wood, A.J. (2002). Characterization of the V-type H⁽⁺⁾-ATPase in the resurrection plant *Tortula ruralis*: accumulation and polysomal recruitment of the proteolipid c subunit in response to salt-stress. *Journal of Experimental Botany* 53:225-232.

- Cloutier, Y. y Andrews, C. J. (1984). Efficiency of Cold Hardiness Induction by Desiccation Stress in Four Winter Cereals. *Plant Physiol.* 76:595–598.
- Cushman, J.C. (2001). Osmoregulation in Plants: Implications for Agriculture. *American Zoologist* 758–769.
- Dice, J.F. (1987). Molecular determinants of protein half-lives in eucaryotic cells. *FASEB J.* 1 :349-357.
- Domínguez-Ramírez, L. y Gómez-Puyou, M.T. (2005). La F₁F₀ ATP sintasa: Un complejo proteico con gran versatilidad estructural y funcional. *TIP Rev.Esp.Cienc.Quím.Biol.* 8:18-27.
- Flower, T.J., Koyama, M.L., Flower, S.A., Sudhakar, K.P. y Yeo, R. (2000). QTL : Their place in engineering tolerance of rice to salinity. *J. Exp. Bot.* 51 :99-106.
- Fujita M., Fujita Y., Noutoshi Y., Takahashi F., Narusaka Y., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol* 9(4):436-42.
- García-Valenzuela, X., García-Moya, E., Rascón-Cruz, Q., Herrera-Estrella, L. y Aguado-Santacruz, G.A. (2005). Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyll cells. *J. Pl. Physiol.* 162:650-661.
- Hitchcock, A. (1950). *Manual of the grasses of the United States* (2ª. edición, revisada por A. Chase). Misc. Publication 200:1-1051. United States Department of Agriculture, Washington, D. C.
- Ho, S.H., Tong, W.F. y Yu, S.M. (2000). Multiple mode regulation of a cysteine proteinase gene expression in rice1. *Plant Physiology* 122:57–66.
- Hwang E.-W., Kim K.-A., Park S.-C., Jeong M.-J., Byun M.-O. y Kwon H.-B. (2005). Expression profiles of hot pepper (*Capsicum annuum*) genes under cold stress conditions. *J. Biosci.* 30:657–667.
- Ingram, J. y Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47:377-403.
- Keller, E. y Steffen, K. L. (1995). Increased chilling tolerance and altered carbon metabolism in tomato leaves following application of mechanical stress. *Physiol. Plant.* 93:519–525.
- Koehler, S.M. y Ho T-HD (1990b). Hormonal regulation, processing, and secretion of cysteine proteinases in barley aleurone layers. *Plant Cell* 2: 769-783.

- Königshofer, H. y Lechner, S. (2002). Are polyamines involved in the síntesis of heat-shock proteins in cell suspensión cultures of tabacco and alfalfa in response to high-temperature stress?. *Plant Physiol. Biochem.* 40:51-59.
- Kramer, J.P. (1983). *Water relations of plants*. USA. Academic Press Inc. CA.
- Lam, H.M., Coschigano, K.T., Oliveira, L.C., Melo-Oliveira, R. Y Coruzzi, G.M. (1996). The Molecular-Genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.* 47 :569-593.
- Lee, W.Y., Hong, J.K., Kim, C.Y., Chun, H.J., Park, H.C., Kim, J.C., Yun, D.-J., Chung, W.S., Lee, S.-H., Lee, S.Y., Cho, M.J. y Lim, C.O. (2003). Over-expressed rice ADP-ribosylation factor 1 (RARF1) induces pathogenesis-related genes and pathogen resistance in tobacco plants. *Physiol. Plant.* 119: 573–581.
- Léon, S., Touraine, B., Ribot, C., Briat, J.F. y Lobréaux, S. (2003). Iron–sulphur cluster assembly in plants: distinct NFU proteins in mitochondria and plastids from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 371:823–830.
- Lorenzo, O. y Solano, R. (2005). Señalización de Ácido Jasmónico e interacciones con otras hormonas. *biojournal.net.* 1-16.
- Lorkovic, Z.J., Lehner, R., Forstner, C., y Barta, A. (2005). Evolutionary conservation of minor U12-type spliceosome between plants and humans. *RNA* 11:1095–1107.
- Maeshima, M. (2000). Vacuolar H⁺-pyrophosphatase. *Biochim. Biophys. Acta* 1465:37–51.
- Marshall, J. y Drumbroff, E. (1999). Turgor regulation via cell wall adjustment in white spruce. *Plant Physiology* 119:313-319.
- McIntosh, K.B., Bonham-Smith, P.C. (2005). The two ribosomal protein L23A genes are differentially transcribed in *Arabidopsis thaliana*. *Genome.* 48:443-54.
- Mikkonen, M. (1996). Genes and genome of *Lactobacillus* phage LL-H. *Acta Univ Oul A* 281: 1-55.
- Mudgett, M. B., y Clarke, S. (1996). A Distinctly-Regulated Protein Repair L-Isoaspartyl Methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 30: 723-737.
- Olvera, J. y Wool, I.G. (1996). The primary structure of rat ribosomal protein L10a. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 220:954-957.

- Orzech, K. A., y Burke, J. J. (1998). Heat shock and the protection against metal toxicity in wheat leaves. *Plant, Cell Environ.* 11:711–714.
- Palma, D.A., Blumwald, E. y Plaxton, W.C. (2000). Upregulation of vacuolar H⁺-translocating pyrophosphatase by phosphate starvation of *Brassica napus* (rapessed) suspension cultures. *FEBS Letters* 486:155-158.
- Petroni, G., Dini, F., Verni, F., Rosati, G. (2002). A molecular approach to the tangled intrageneric relationships underlying phylogeny in Euplotes (Ciliophora, Spirotrichea). *Mol Phylogenet Evol.* 22:118-30.
- Rechsteiner, M., Hoffman, L., Dubiel, W. (1993). The multicatalytic and 26S proteases. *J. Biol. Chem.* 268 :6065-6068.
- Sahi, C., Agarwal, M., Reddy, M.K., Sopory, S.K. y Grover, A. (2003). Isolation and expression analysis of salt stress-associated ESTs from contrasting rice cultivars using a PCR-based subtraction method. *Theor Appl. Genet.* 106:620-628.
- Schulze, E.D., Robichaux, R., Grace, J., Rundel, P.W. y Ehlaringer, J.R. (1987). Plant water Balnce. *BioScience* 37:30-47.
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997). Gene expression and signal transduction in warer-stress response. *Plant Physiology* 115:327-334.
- Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 6:410-417.
- Shintani, D.K., Roesler, K., Shorrosh, B.S., Savage, L. y Ohlrogge J.B. (1997). Antisense expression and overexpression of biotin carboxylase in tobacco leaves. *Plant Physiology* 114: 881-886.
- Vranová, E., Atichartpongkul, S., Villarroel, R., Montagu, M.V., Inzé, D., y Camp, W.V.(2002). Comprehensive analysis of gene expression in *Nicotiana tabacum* leaves acclimated to oxidative stress. *PNAS* 99: 10870–10875.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. y Altman, A. (2004). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9:244-252.
- Weaver, J.E., y Clements, F.E. (1938). *Plant Ecology*. Second Edition. McGraw-Hill. Nex York. 345.
- Xiong, L. y Zhu, J.K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell and Enviroment* 25:131-139.

-
- Ye, H., Pilon, M. y Pilon-Smits, E. A. H. (2006). CpNifS-dependent iron-sulfur cluster biogenesis in chloroplasts. *New Phytologist* 171: 285–292.
- Zhang, H-X. y Blumwald, E. (2001). Transgenic salt tolerant tomato plants accumulate salt in the foliage but not in the fruits. *Nature Biotechnology* 19:765-768 .
- Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 53:247-273.
- Zhu, J.-K., Shi, J., Bressan, R.A. y Hasegawa, P.M. (1993). Expression of an *atriplex nummularia* gene encoding a protein homologous to the bacterial molecular chaperone DnaJ. *The Plant Cell* 5:341-349.
- Zhu, W. y Brendel, V. (2003). Identification, characterization and molecular phylogeny of U12-dependent introns in the *Arabidopsis thaliana* genome. *Nucleic Acids Res.* 31:4561–4572.