



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

**Respuesta comparativa al estrés salino entre
Capsicum annuum var. *glabriusculum* y
Capsicum annuum var. *annuum*: Análisis
molecular, fisiológico y morfométrico**

T E S I S

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos
Naturales
(Orientación en Biotecnología)

p r e s e n t a

Diana Medina Hernández

La Paz B.C.S. Junio del 2009

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 12:00 horas del 29 de abril del 2009, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

"Respuesta comparativa al estrés salino entre *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* y *Capsicum annuum* var. *annuum*: Análisis molecular, fisiológico y morfométrico"

Presentada por el alumno:

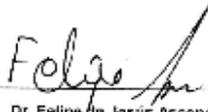
Diana Medina Hernández

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

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

LA COMISION REVISORA


Dra. Gracia A. Gómez Anduro
DIRECTOR DE TESIS


Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle
CO-TUTOR


Dr. Juan Angel Larrinaga Mayoral
CO-TUTOR


Dra. María Servilero Zaragoza
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CONFORMACIÓN DEL COMITÉ TUTORIAL

Dr. Roberto Carlos Vázquez Juárez. Director de tesis	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro. Directora de tesis	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle. Co-Tutor	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste
Dr. Juan Ángel Larrinaga Mayoral. Co-Tutor	Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste

COMITÉ REVISOR

Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro.
Directora de tesis

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle.
Co-Tutor

Dr. Juan Ángel Larrinaga Mayoral.
Co-Tutor

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Directora de tesis: Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro

Co-Tutor: Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle.

Co-Tutor: Juan Ángel Larrinaga Mayoral

Suplente: Dra Alejanda Nieto Garibay

Resumen

El problema de salinidad afecta más de 800 millones de hectáreas a nivel mundial, principalmente limitando el potencial de producción de cultivos de especies glicófitas seleccionadas por su rápida tasa de crecimiento y alto rendimiento. Esta selección artificial ha conducido a que las plantas domesticadas presenten distintos patrones de tolerancia al estrés salino que las plantas silvestres. Se ha documentado que estos los parientes silvestres son un valioso acervo genético que pueden ayudar a elucidar los mecanismos moleculares de tolerancia a diversos factores bióticos o abióticos estresantes. Un cultivo importante a nivel mundial es el chile poblano (*Capsicum annuum* var. *Annuum*). Su contraparte silvestre es el chile chiltepin (*C. annuum* var. *Glabriusculum*). El objetivo general de este trabajo fue determinar por parámetros fisiológicos y morfométricos la tolerancia a salinidad de *C. annuum* var. *glabriusculum* e identificar por técnicas moleculares los genes involucrados en este fenómeno, así como evaluar la expresión de algunos de ellos en *C. annuum* var. *annuum*. Para determinar la resistencia del chiltepin y chile poblano a la salinidad, se realizó un bioensayo con los siguientes tratamientos: riego por 30 días con solución nutritiva Hoagland con NaCl (0 mM, 50mM, 100mM, 200mM, 300mM). Se evaluaron los parámetros de transpiración, área foliar, peso seco y fresco de hoja, de tallo, y de raíz, y se realizó un análisis del contenido de minerales en esos tejidos. Los resultados mostraron que el chiltepin, a diferencia del chile poblano, posee los siguientes mecanismos fisiológicos para tolerar altas concentraciones de NaCl: (1) disminuye la tasa de transpiración y luego la mantiene constante, (2) no se ve afectada la producción de clorofilas, (3) acumula iones de Na⁺ en la hoja; mientras que en los análisis morfométricos (comparado con un Índice de Crecimiento Relativo) se encontró que: (1) aumenta el crecimiento de la raíz, (2) no se ve afectado el número de hojas y el área foliar, lo que indica que el chiltepin toleró el estrés salino inducido. Por otra parte, para evaluar la expresión diferencial de genes por el fenómeno de salinidad, se hizo un bioensayo con chiltepin sometido a estrés salino. Plantas de chiltepin se agruparon en Control, Tratamiento A (NaCl 300 mM y muestreo de hoja a los 30 minutos post-aplicación de NaCl) y Tratamiento B (con muestreo de hoja a las 24 horas post-aplicación de NaCl). El material genético obtenido se analizó por Despliegue Diferencial (DD) y por Amplificación con oligonucleótidos específicos (AOE). Del análisis de los perfiles electroforéticos de DD se seleccionaron 10 amplicones y de AOE se obtuvieron 12 genes. Para comparar y evaluar la expresión génica entre chiltepin y chile poblano, se realizaron macroarreglos en donde se inmovilizaron los genes obtenidos por expresión diferencial y se hibridaron con sondas marcadas con digoxigenina. Las sondas se sintetizaron a partir del material genético obtenido chile poblano sometido bajo las mismas condiciones del segundo bioensayo. El análisis de los resultados indicaron que los genes que no hibridaron entre chile chiltepin y chile poblano fueron: Acetolactato sintasa, Inhibidor de la disociación GDP, DEA-1, Esterasa del chile, Subunidad α de E1 de la piruvato deshidrogenada, una con función desconocida, 24 DDRP5, 17 DDRP5, 9 DDRP6, 14 DDRP6 y 20 DDRP6. Los niveles de expresión de dichos genes en las dos variedades tienen una expresión opuesta y pueden estar involucrados en las diferencias a la resistencia al estrés salino entre el chile chiltepin y el chile poblano. Adicionalmente se depositaron 6 secuencias de expresión (ESTs) de chiltepin bajo estrés salino en el GenBank.

Abstract

At world-wide level, 800 million hectares are affected by salinity, mainly of the limitation in crop production potential of glycophytes species which have been selected by their fast growth and high yield. This artificial selection in domesticated plants has led different patterns of salt stress tolerance compared with wild plants. It has been documented that cultivated parents of wild plants have valuable gene pool that can help to elucidate molecular mechanisms of biotic and/or abiotic tolerance stress. One of the most worldwide important crops is the chili poblano (*Capsicum annuum* var. *annuum*). Its wild counterpart is chili chiltepin (*C. annuum* var. *glabriusculum*). The general objective of this research work was to determine physiological and morphometric parameters of salinity resistance in *C. annuum* var. *glabriusculum* and to identify genes involved in this phenomenon as well as to evaluate some of selected genes in *C. annuum* var. *annuum*. In order to determine the salt stress resistance of chiltepin and chili poblano, a bioassay was performed following the next treatments: 30 days of irrigation with Hoagland nutrient solution containing NaCl (0 mM, 50mM, 100mM, 200mM, and 300mM). The transpiration parameters, leaf area, dry and fresh weight of leaf, stem, root, and analyses of mineral contents were determined. The obtained results demonstrated that chiltepin, unlike chilli poblano, had physiological mechanisms to resist NaCl stress such as: (1) transpiration rate is decreased and then it is kept at constant level, (2) chlorophyll production is unaffected, (3) sodium (Na⁺) ions are accumulated in leaf; while morphometrics analyses found were: (1) an increase of root growth, (2) the number of leaf and the foliar area is maintained. These data showed that chiltepin was not affected by salt stress when it was compared with an index of relative growth rate. To assess the differential expression of genes by the phenomenon of salinity a bioassay was developed. Chiltepin was grouped consisting of control plants, Treatment A (300 mM NaCl and leaf sampling at 30 minutes post-salt application) and Treatment B (leaf sampling at 24 hours post-salt application). Genetic material obtained was analyzed using Deployment Differential (DD) and Amplification with specific oligonucleotide (AOE). Ten amplicons of DD and 12 genes of AOE from electrophoretic profile analyses were obtained. To compare and to evaluate gene expression between chiltepin and chili poblano, macroarrays were done. Genes obtained from DD were immobilized and hybridized with probes labeled with digoxigenin. Probes used were sinterized from genetic material of chili poblano sumited under the same conditions as second bioassay. The results showed that the genes of chile chiltepin did not hybridize with chili poblano were: acetolactate synthase, GDP dissociation inhibitor, DEA-1, esterase of chile, the α subunit of pyruvate dehydrogenase E1, with an unknown function, 24 DDRP5, 17 DDRP5, 9 DDRP6, 14 DDRP6 and 20 DDRP6. Levels of gene expression of two varieties have opposed expression and probably, it could be related to differences in salt stress resistance between chiltepin and chilli poblano. Additionally, 6 gene sequences (ESTs) from chiltepin under salt stress were deposited in GenBank.

Dedicatoria

Mami esta tesis la logre GRACIAS a tu Amor y apoyo incondicional
 Dedicaste tu espacio a que mi niñez y juventud fueran de color de rosa
 Recuerdo cuando de la mano me llevabas a la escuela
 Esperando tal vez que algún día lograra ser alguien en la vida.

Este es fruto de tu ejemplo de perseverancia, de la valentía que siempre has
 mostrado ante los problemas y sobre todo del amor de una madre por un hijo.

Padre

Gracias por enseñarme con hechos que la voluntad es una virtud.
 Mi respeto y admiración por la vida recta que me has enseñado
 Me has mostrado que la paciencia y serenidad nos dan fortaleza
 Te quiero mucho, eres el mejor padre del mundo.

Saúl

Hermano Hemos aprendido que la vida es una ruleta, que las leyes de la
 naturaleza se cumplen y que en la forma que las usemos nos serán devueltas,
 espero que sigamos siempre caminando juntos y apoyándonos en la razón como
 hasta ahora gracias por ser mi hombro. Karen y Sofí mis sobrinas.

Martín

El amor verdadero que me dio cupido.
 Por tu dedicación a hacerme feliz.
 Brindarme seguridad y confianza.
 Te amo y siempre te amare.
 Mi corazón es tuyo.

Mis hijos:

Isaac

El sonriente y juguetón, el regalo de Dios como recompensa de mi amor. Te
 adoro.

Perla

Mi hermosa y dulce nena, llenas mi vida de ternura y felicidad, siempre estás en
 mi corazón.

Javier

Eres un ángel de luz, tu chispa inquieta mueve montañas, eres mi motor de
 arranque gracias por llegar a alegrar mi vida, te quiero mucho.

Gracias mi familia por su tiempo, su apoyo, comprensión y amor cada uno tiene un lugar especial en mi corazón pero a todos los quiero y por ustedes me esforzare cada día de mi vida en ser mejor.

Dr. Roberto Vázquez Juárez

Donde quiera que se encuentre hago una reverencia solemne ante un investigador capaz, comprometido y dedicado a sus estudiantes.

Este trabajo de investigación lo arranco con bríos y gracias a Dios lo terminamos y cada momento pensando en que él lo hubiera querido así, pese a su ausencia, siempre sentí que me apoyaba de alguna manera en los momentos en los que ya no veía el camino, algo mágico sucedía y de nuevo veía la luz para seguir adelante. Descanse en Paz.

DIOS gracias por darme tanto en la vida, lo único que puedo pedirte es que me sigas guiando por el camino del amor y la verdad.

Agradecimientos

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el apoyo de la beca No 206750.
- Proyecto SEP- CONACyT -2004-C01-45918: Identificación y caracterización de genes involucrados en la tolerancia al estrés salino en halófitas y determinación de posibles genes ortólogos en glicófitas de importancia agronómica.
- Romero Geraldo María de Jesús. Por todo el apoyo y enseñanzas, eres ejemplo de que el querer es poder.
- A los técnicos de Laboratorio de Biotecnología Vegetal: Rodríguez Álvarez Margarito, gracias por tu apoyo y comprensión en los momentos de angustia; Arce Montoya Mario gracias por sus asesorías y orientación.
- A las técnicas del Laboratorio de Fisiotecnia Vegetal: Lidia Hiraes Lucero, y María del Carmen.
- A don Amado Cota Cosió persona realmente trabajadora del campo agrícola.
- Horacio Sandoval Gómez, Beatriz Adriana Gálvez González, Claudia Elizabeth Olachea León, por todo el apoyo y paciencia que tienen.
- Lic. Osvelia Ibarra Morales del Departamento de Control Escolar, por su gentileza para atenderme, Lic. Leticia González Rubio Rivera, Departamento de Becas y Apoyo Estudiantil gracias por todo el apoyo otorgado.
- Dr. Fco. Vargas por su apoyo en lo académico, materiales y equipo de laboratorio durante mi estancia en su laboratorio de Microarreglos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo AC. (CIAD), Hermosillo, Sonora.
- Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICyT).
- Julio Antonio Hernández González Técnico del Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, por su apoyo y amistad de muchos años.
- A mis queridos compañeros y amigos del laboratorio de patogénesis: Rosario, Tania, Irasema, Norma, Carlitos, Martita, Estercita, Artemio, Azul Celeste, Delia.
- A los saladitos: Mario, Julio, Adriana, Kalin, Diana y Gracia.
- A mi amiga de toda la maestría la carismática Adriana. Como aprendimos cosas gracias a los drásticos cambios que ocurrieron.
- A mis tutores por enseñarme, asesorarme y guiarme durante el largo y arduo camino que requiere la investigación.
- A todos los que forman parte de la academia de agricultura de zonas áridas por la atención y los comentarios brindados en los seminarios.
- Dr. Raúl David Aguilar López por sus análisis.
- Gracias a todos mis amigos del laboratorio por hacer menos difícil las largas jornadas de trabajo, por estar ahí en los momentos donde se siente que todo se derrumba siempre alguien te ofrece una palabra de consuelo, siempre recordare las tardes de mangle que no solo sirven de desestresante si no de retroalimentación.

CAMINANTE NO HAY CAMINO SE HACE CAMINO AL ANDAR

Índice de contenido

Resumen	I
Abstract	¡Error! Marcador no definido.
Dedicatoria	III
Agradecimientos.....	V
Índice de contenido	VI
Índice de tablas	VIII
Índice de figuras	IX
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1. Salinidad en agricultura	4
2.2. Efectos del estrés salino	4
2.2.1 Efecto osmótico.....	5
2.2.2 Efecto iónico.....	5
2.2.3 Efecto de la sal en el deterioro de las propiedades físicas del suelo	6
2.3 Mecanismos de tolerancia a la salinidad	6
2.3.1 Ajuste osmótico	8
2.3.2 Solutos compatiblesIV	9
2.3.3 Absorción y compartimentalización de Iones	10
2.4. Mejoramiento genético de plantas	11
2.5. El genero Capsicum como modelo de estudio.....	12
III. HIPÓTESIS	14
IV. OBJETIVOS.....	14
Objetivo General.....	14
Objetivos Particulares.....	14
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
5.1 Bioensayo de estrés salino	15
5.2 Evaluación de parámetros fisiológicos en respuesta al estrés salino.	16
5.2.1 Transpiración, humedad relativa, temperatura y radiación.....	16
5.2.2 Clorofila a, b y total.....	17
5.2.3 Área foliar.....	17
5.2.4 Análisis minerales	17
5.3 Evaluación de la expresión de genes de chiltepín y chile poblano, en respuesta a estrés salino.	18
5.3.1. Expresión diferencial de genes de chiltepín bajo estrés salino, mediante Despliegue diferencial (DD).	18
5.3.2 Amplificación de genes usando oligonucleotidos específicos, obtenidos de un banco de genes sustractivo de chile	20
5.4 Evaluación de la expresión diferencial de genes de chile chiltepín y chile poblano mediante la técnica de Macroarreglos	23
5.4.1 Preparación de la sonda	23
5.4.2 Cuantificación de la sonda por quimioluminiscencia.	23
5.4.3 Inmovilización del ADN a la membrana.....	24
5.4.4 Hibridación	24
5.4.5 Detección por quimioluminiscencia	24

5.4.6 Cuantificación de la cantidad de ARNm	25
VI. RESULTADOS.....	26
6.1 Evaluación del porcentaje de germinación	26
6.1.2 Evaluación de la resistencia al estrés salino 30 días / NaCl.....	26
6.1.3 Transpiración	27
6.1.4 Clorofilas	28
6.1.5 Área foliar y número de hojas	29
6.1.6 Peso fresco y seco de hoja	31
6.1.7. Peso fresco y seco de raíz.....	32
6.1.8 Peso fresco y seco de tallo	32
6.1.9 Análisis minerales	36
6.2 Evaluación de la expresión de genes de chiltepín y chile poblano, en respuesta a estrés salino.....	45
6.2.1. Expresión diferencial de genes de chiltepín bajo estrés salino, mediante Despliegue diferencial (DD)	45
6.2.2 Amplificación de genes usando oligonucleotidos específicos, obtenidos de un banco de genes sustractivo de chile	48
6.3 Evaluación de la expresión diferencial de genes de <i>C. annum</i> var. <i>glabriusculum</i> (chiltepín) y <i>C. annum</i> var. <i>annuum</i> (poblano) mediante la técnica de Macroarreglos.....	54
VII DISCUSIÓN	58
VIII. CONCLUSIONES	81
IX. BIBLIOGRAFIA	82
X. ANEXOS	91

Índice de tablas

Tabla I. Secuencia de primer aleatorios utilizados en la técnica de DD.....	19
Tabla II. Lista de Oligonucleotidos empleados para amplificar genes de chiltepín y poblano en control y los dos ratamientos.....	21
Tabla III. Efecto de la salinidad inducida por NaCl en el índice de crecimiento relativo (ICR) del peso seco de partes vegetales. Los valores son el promedio de tres repeticiones.....	35
Tabla IV. Relaciones iónicas en hoja, tallo y raíz de chile poblano y chiltepín.....	37
Tabla V. Total de bandas expresadas diferencialmente en hojas de chiltepín bajo estrés salino	48
Tabla VI. Esquematización de la amplificación del PCR de punto final. Las cruces indican la presencia de la expresión de genes en cDNA de chiltepín y chile poblano bajo condiciones (C) control, (A) NaCl 300 mM, muestreo 30 min. y (B) NaCl 300 mM, muestreo 24 h.....	49
Tabla VII. Número de acceso en la base de datos del GenBank para los genes de chiltepín.....	53
Tabla VIII. Evaluación de la expresión de genes por macroarreglos, con genes de chile poblano inmovilizados y sonda marcada de ADNc chile poblano de control, tratamiento A y tratamiento B.....	54
Tabla IX. Evaluación de la expresión de genes por macroarreglos, con genes de chile chiltepín inmovilizados y sonda marcada de ADNc chile poblano de control, tratamiento A y tratamiento B.....	55

Índice de figuras

Figura 1. Mecanismos de respuesta para re-establecer la homeostasis y proteger o reparar los daños a las proteínas y membranas (Vinocur y Altma, 2005)...	7
Figura 2. Morfología del chile poblano <i>C. annum</i> var. <i>annuum</i> y <i>C.annuum</i> var. <i>glabriusculum</i>	13
Figura 3. Acomodo de las plantas de <i>C. annum</i> var. <i>annuum</i> y <i>C.annuum</i> var. <i>glabriusculum</i> para el bioensayo.....	27
Figura 4. Tasa de transpiración de <i>Capsicum annum</i> var. <i>glabriusculum</i> y <i>Capsicum annum</i> var. <i>annuum</i> bajo diferentes concentraciones de salinidad.....	28
Figura 5. Contenido de clorofila a, b y total de <i>Capsicum annum</i> var. <i>glabriusculum</i> y <i>Capsicum annum</i> var. <i>annuum</i> bajo diferentes concentraciones de salinidad.....	29
Figura 6. Área foliar de <i>Capsicum annum</i> var. <i>glabriusculum</i> y <i>Capsicum annum</i> var. <i>annuum</i> bajo diferentes concentraciones de salinidad.....	30
Figura 7. Número de hojas de <i>Capsicum annum</i> var. <i>glabriusculum</i> y <i>Capsicum annum</i> var. <i>annuum</i> bajo diferentes concentraciones de salinidad.....	30
Figura 8. Peso Seco y peso Fresco de las hojas de <i>Capsicum annum</i> var. <i>glabriusculum</i> y <i>Capsicum annum</i> var. <i>annuum</i> bajo diferentes concentraciones de salinidad.....	31
Figura 9. Peso fresco y peso seco de la raíz de <i>Capsicum annum</i> var. <i>glabriusculum</i> y <i>Capsicum annum</i> var. <i>annuum</i> bajo diferentes concentraciones de salinidad.....	33
Figura 10. Peso fresco y peso seco del tallo de <i>Capsicum annum</i> var. <i>glabriusculum</i> y <i>Capsicum annum</i> var. <i>annuum</i> bajo diferentes concentraciones de salinidad.....	34
Figura 11. Contenido de cationes en hojas, tallo y raíz de <i>Capsicum annum</i> var. <i>glabriusculum</i> y <i>Capsicum annum</i> var. <i>annuum</i> bajo diferentes concentraciones de salinidad.....	39
Figura 12. Relación entre contenido de Na ⁺ y peso seco en raíz, tallo y hojas de <i>Capsicum annum</i> var. <i>glabriusculum</i> y <i>Capsicum annum</i> var. <i>annuum</i> bajo diferentes concentraciones de salinidad.....	40
Figura 13. Contenido de aniones en hojas, tallo, y raíces de de <i>Capsicum annum</i> var. <i>glabriusculum</i> y <i>Capsicum annum</i> var. <i>annuum</i> bajo diferentes concentraciones de salinidad.....	42
Figura 14. Relación entre contenido de NO ₃ ⁻ y Cl ⁻ en hojas, tallo y raíces de <i>Capsicum annum</i> var. <i>glabriusculum</i> y <i>Capsicum annum</i> var. <i>annuum</i> ..	44
Figura 15. Contenido de fósforo en raíz, tallo y hojas de <i>Capsicum annum</i> var. <i>glabriusculum</i> y <i>Capsicum annum</i> var. <i>annuum</i> ..	44
Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa-formaldehido al 1 % de extracción de ARN total.....	45
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa-formaldehído al 1%. de ARN total de chile chiltepin control, tratamiento A y Tratamiento B.....	46
Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Evaluación de la calidad del ADNc.	46

Figura 19. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Urea 6%) teñidos con nitrato de plata.	47
Figura 20. Análisis de BLAST2 de las secuencias nucleotídicas de chiltepín con chile guajillo.	52
Figura 21. Expresión de genes tempranos y tardíos por efecto del estrés salino.	56
Figura 22. Estructuras que forman la cadena de ARN	70

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, mas de 800 millones de hectáreas de terrenos están afectados por salinidad (Food and agriculture organization, 2008). La mayoría de los suelos salinos se encuentran en las zonas áridas y semiáridas y se han formado de manera natural mediante la intemperización de las rocas que liberan sales solubles que se acumulan a través del tiempo (Rengasamy, 2002). Sin embargo, el empleo del riego en los cultivos ha incrementado notablemente este fenómeno y de acuerdo con la Food and agriculture organization (2008), el 20% de los terrenos agrícolas que utilizan riego presentan problemas de salinidad.

La transformación de grandes extensiones de zonas áridas y semiáridas a terrenos agrícolas productivos se ha dado por la utilización de diversos sistemas de riego que permiten el cultivo de plantas. Estos sistemas aumentan gradualmente la concentración de sales solubles en el suelo, principalmente cloruros de sodio, calcio y magnesio, y en menor grado, sulfatos y carbonatos. Esta cantidad excesiva de sales no solamente daña los procesos microbiológicos, propiedades físicas y químicas del suelo, sino que también ocasiona un estrés en las plantas cultivadas que afecta negativamente sus procesos fisiológicos y bioquímicos que conducen a la reducción del potencial productivo de la mayoría de los cultivos de importancia agronómica (Mass y Hoffman, 1977; Rhoades y Loveday, 1990). Por consiguiente, el entendimiento de la tolerancia a la salinidad en las plantas es de fundamental importancia y constituye uno de los principales temas de investigación.

El interés por mejorar la tolerancia de los cultivos a la salinidad ha conducido a la realización de numerosas investigaciones enfocadas a explicar las respuestas a la salinidad desde perspectivas agronómicas (Maas, 1986; Shannon, 1994), ecofisiológicas (Greenway y Munns, 1980), bioquímicas (Hasegawa et al , 2000) y genéticas (Inan et al., 2004; Zhu 2002).

No obstante de que se ha generado mucha información acerca de los procesos celulares, metabólicos, moleculares y genéticos asociados con las respuestas de las plantas al estrés salino, aun se requieren estudios para la identificación de genes y su posible utilización para mejorar la tolerancia al estrés salino en plantas cultivadas mediante procedimientos biotecnológicos.

Desde hace varias décadas se conoce que existen diferencias en la tolerancia a la salinidad entre especies, incluso entre cultivares o variedades de la misma especie, y que esto debe ser aprovechado en los programas de mejoramiento genético para transferir tolerancia a especies que tienen gran importancia económica, pero que son sensibles al estrés salino.

Las halófitas son plantas adaptadas a hábitats salinos y pueden crecer en medios que contienen más de 250 mM de NaCl. Por esta razón, algunas halófitas y especies silvestres con estos mecanismos de tolerancia a la salinidad se han estado estudiando ya que pueden ser fuentes de genes que contribuyan a mejorar el comportamiento de las plantas bajo estrés salino. Existen diversos estudios de respuesta comparativa al estrés salino entre especies silvestres y especies domesticadas. (Colmer et al., 2006), reportó el potencial genético de especies silvestres emparentadas con trigo para mejorar la tolerancia al estrés salino de este cultivo. También se ha indicado que la cebada tiene parientes halofílicos que podrían ser utilizados como fuentes de genes para aumentar la tolerancia a la salinidad en cebada domesticada (Garthwaite et al., 2005). Este tipo de estudios son bastante escasos en hortalizas. Los más reportados son en tomate en donde evalúan especies silvestres como *Lycopersicon pimpinellifolium*, *L. cheesmanii*, *L. chilense*, *L. peruvianum*, entre otras, que están emparentadas con los cultivares actuales como recursos genéticos que pueden potencialmente ser utilizados para aumentar la tolerancia al estrés salino del tomate domesticado (Shannon et al., 1987; Bolari et al., 1991; Cuartero et al., 2006).

Una de las hortalizas de gran importancia agronómica, económica y comercial es el chile (*Capsicum annuum*, L.), ya que después del tomate es la segunda hortaliza que más se consume en el mundo. México se encuentra ubicado entre

los primeros lugares a nivel mundial como país exportador de hortalizas y dentro de las hortalizas que se exportan, se encuentran algunos tipos de chile del género *Capsicum*. A nivel mundial, México ocupa el segundo lugar como productor de chile (FAO, 2005) Los tipos de chiles (*Capsicum annuum*) que más se cultivan y que tienen mayor mercado de exportación son: California, morrón y ancho o poblano (Bancomext, 1999). En Baja California Sur, el chile es uno de los cultivos de mayor importancia socioeconómica y por esta razón su cadena productiva es considerada como prioritaria para el Estado.

El género *Capsicum* esta formado por alrededor de 30 especies, siendo México el país con la mayor diversidad genética de este género, de las cuales *C.annuum*, *C. Chinense*, *C. frutescens*, *C. baccatum* y *C. pubescens* son domesticadas y cultivadas. *C.annuum* var. *annuum* es la especie mas cultivada y su progenitor silvestre es *C.annuum* var. *glabriusculum* (Pickersgill,1971;1984). Por su importancia socioeconómica, y aprovechando que los parientes silvestres de las plantas cultivadas de chile son un valioso acervo genético que puede ayudar a entender los procesos bioquímicos y moleculares que se alteran por el estrés salino es de particular importancia desarrollar estudios enfocados a incrementar la comprensión de los mecanismos de tolerancia a la salinidad y los genes que los regulan para que contribuya a la solución de problemas en agricultura con condiciones salinas. (Harlan, 1976; Stalker 1980; Burdon y Jarosz 1989).

II. ANTECEDENTES

2.1. Salinidad en agricultura

La salinidad se refiere a la presencia de una elevada concentración de sales en la superficie del suelo. Este grave problema de salinidad es debido a las malas prácticas de riego y el inadecuado suministro de nutrientes; dando como resultado un efecto adverso sobre la vida de las plantas. De ésta forma se ve afectada severamente la producción en los campos agrícolas que tienen estas características. La situación más frecuente es salinidad por NaCl pero, ¿cuándo consideramos a un suelo salino?, desde el punto de vista agrícola se considera un suelo salino si su conductividad eléctrica es igual ó superior a 4dS/m y desde el punto de vista ecológico se habla de suelo salino si la concentración de NaCl es superior a 70mM ya que éste es el límite a partir del cual se observa la flora halófitas (plantas adaptadas a condiciones salinas) y ya no sobreviven las glicófitas (plantas no adaptadas a condiciones salinas).

2.2. Efectos del estrés salino

El estrés es el “conjunto de respuestas bioquímicas o fisiológicas que definen un estado particular del organismo diferente al observado bajo un rango de condiciones óptimas” (Larcher,1995). Asimismo, se aplicará el término resistencia al estrés para definir “la capacidad de un organismo para evitar los estímulos ambientales negativos o para permanecer bajo un estado particular de estrés sin que su fenotipo se vea modificado de manera significativa” (Benavides,2002). Algunas manifestaciones fenotípicas son visuales como deformaciones, amarillamientos, manchados, necrosis, etc., pero otras requieren de equipo especializado para detectarlas, por ejemplo disminución en la actividad de asimilación de CO₂, la inducción de la transcripción de ciertos genes, cambios en la composición química de ciertas estructuras, etc. (Benavides, 2002). El efecto general del estrés por salinidad se observa en una reducción de la tasa de crecimiento resultando de ello son disminución del: tamaño de la hoja, número de hojas y altura. Las raíces también disminuyen su longitud y biomasa aunque

pueden ser más delgadas o más gruesas. Igualmente, la tasa de maduración puede ser mayor o menor dependiendo de la especie. El grado en el cual el crecimiento es disminuido difiere grandemente entre especies y en menor extensión, entre cultivares o variedades dentro de especie. La severidad de la respuesta a la salinidad depende de la interacción con otras variables ambientales como la humedad, temperatura y radiación. (Munns y Termaat 1986; Jacoby, 1994). La tolerancia o resistencia a la salinidad es la habilidad inherente de la planta para resistir los efectos de altas cantidades de sales en la zona radical o en los tejidos foliares sin que se presenten efectos adversos. Se considera que la tolerancia a la salinidad es un carácter cuantitativo complejo controlado por muchos genes (Shannon y Noble, 1990; Shannon, 1996), por lo que en los últimos años se ha estudiado desde el punto de vista fisiológico, molecular y genético, (Cushman y Bohnert 2000), (Sairam y Tyagi 2004).

2.2.1 Efecto osmótico

El efecto osmótico de la salinidad contribuye principalmente a obtener una baja tasa de crecimiento ya que reduce el potencial hídrico de la solución del suelo disminuyendo así la disponibilidad de agua. Lo anterior ocasiona:

- a) Estrés hídrico: pérdida de turgencia, inhibición de la extensión celular, inhibición de la acumulación de clorofila en hojas, pérdida de regulación estomática, entre otras.
- b) Modificación de la conformación proteica y permeabilidad de la membrana: inactividad enzimática, inhibición del crecimiento y generación de osmolitos secundarios.

2.2.2 Efecto iónico

Éste tipo de efecto es específico de toxicidad iónica, se refiere a la competencia de un ión en particular por el sitio del cofactor protéico (Bernstein et al., 1974) o bien a la ocurrencia de cambios conformacionales en las proteínas. Se manifiesta como daño en hojas y meristemas o bien por síntomas típicos de desórdenes nutricionales. Modifican el color de las hojas, la tasa de madurez y el cociente

entre la biomasa aérea y la biomasa de la raíz. Los principales elementos asociados al efecto iónico específico son: el sodio, el cloruro y el boro pero su efecto varía incluso entre especies vegetales cercanas (Kafkafi, 1987; Silberbush y Ben Asher, 1987). Cuando el contenido de sales rebasa cierto umbral entonces la estructura del polipéptido se ve modificada disminuyendo o inhabilitando su función. Los sistemas enzimáticos de la glicólisis, el ciclo de Krebs y la fotofosforilación son especialmente sensibles a estos cambios conformacionales inducidos por el agua salina, resultando en una menor disponibilidad de energía, menor adquisición de nutrientes minerales y en general en un retardo en el crecimiento de la plántula o la germinación de las semillas (Larcher, 1995).

2.2.3 Efecto de la sal en el deterioro de las propiedades físicas del suelo

Los suelos afectados por sales son variables en su composición química y física: estos difieren en su pH, distribución, contenido y naturaleza en el perfil, temperatura, contenido de arcilla y tipo de sales.

Por ejemplo la abundancia del sodio frente al calcio y magnesio absorbido en las arcillas del suelo puede determinar la individualización y dispersión de estas partículas (suelo alcalino o sódico). Bajo éstas condiciones, la aireación puede ser deficiente, lo que trae consigo una reducción del porcentaje de germinación de las semillas, anoxia, etc. El grado de afecciones pueden variar en el transcurso del tiempo, generalmente incrementándose, bajo tales condiciones, pocas especies de plantas pueden vivir en estos suelos. Muy pocos cultivos tienen tolerancia genética a la salinidad para crecer en tales suelos.

2.3 Mecanismos de tolerancia a la salinidad

La salinidad ejerce un efecto complejo en la planta, como resultado de una interacción iónica, osmótica y nutricional, aunque el mecanismo fisiológico exacto del estrés por salinidad es aún desconocido. La tolerancia a la salinidad frecuentemente depende de la complejidad anatómica y fisiológica de la planta. Los mecanismos de tolerancia a la salinidad se basan en factores tales como la

acumulación de iones, exclusión de iones, producción de solutos compatibles los cuales son codificados por un gran número de genes, (Vinocur y Altman 2005). Muchos investigadores han sugerido que algunos de estos factores pueden seleccionarse en una reingeniería individual, un proceso referido a los caracteres piramidales. El oligonucleótidos paso en la transducción de señales lo constituye la percepción del estímulo por parte de receptores específicos. Estos a su vez inician o suprimen cascadas de transducción de señales que activan factores de transcripción (Fig.1), induciendo de esta forma la expresión de genes específicos.

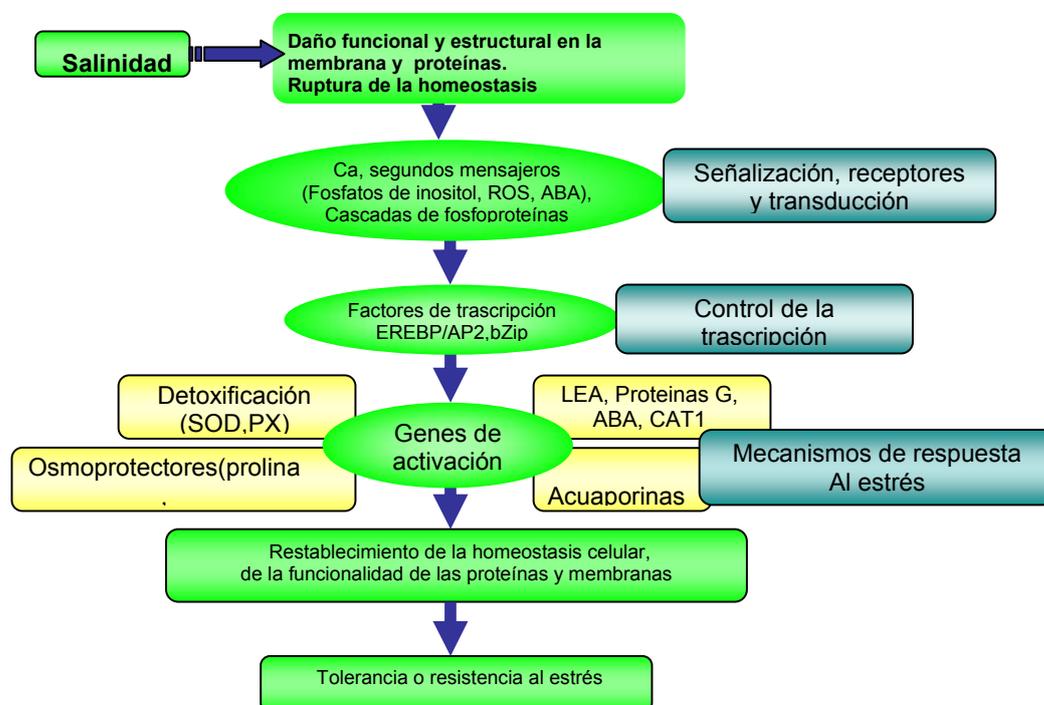


Figura 1. Mecanismos de respuesta para re-establecer la homeostasis y proteger o reparar los daños a las proteínas y membranas (Vinocur y Altma, 2005).

Sanders et al.(1999) sugiere que el calcio actúa en muchos procesos de señalización intracelular. La concentración de calcio se encuentra estrictamente controlada: el calcio citosólico se encuentra en bajas concentraciones, aunque luego de la estimulación se libera de las reservas intracelulares o entra a la célula a través de canales.

Zhu y colaboradores en el 2000 clonaron varios genes SOS (SALT Overly Sensitive) de *Arabidopsis thaliana* que muestran la vía de señalización que lleva a la tolerancia a la salinidad. Los tres genes principales son SOS1, SOS2 y SOS3. El gen SOS3 se une al calcio y desencadena la respuesta al interactuar y activar a SOS2, una serin-treonincinasa. Ambos genes a su vez activan SOS1 que codifica un antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática. Además de estos genes, recientemente se secuenció el antiportador Na^+/H^+ AtNHX1 en *Arabidopsis* (Blumwald et al., 2001). Un aumento en la concentración intra o extracelular de Na^+ provoca una señal citoplasmática de calcio que induce la expresión y cambio de actividad de los transportadores de iones Na^+ , K^+ y H^+ (Jian-Kang Zhu, 2001).

Xiong y Zhu (2001) descubrieron una posible vía de señalización de estrés salino que indica que existirían receptores con características de proteinasas y de histidinkinases que actuarían como sensores de las señales de estrés.

Los genes inducidos por estrés, incluyen genes de respuesta temprana que se inducen de forma inmediata y por lo general, transitoriamente. Estos codifican factores de transcripción que activan a los genes de respuesta tardía, cuya expresión se activa más lentamente y es sostenida en el tiempo (Puebla A 2004).

2.3.1 Ajuste osmótico

La presencia de sales en el suelo reduce la disponibilidad hídrica para la planta al aumentar la presión osmótica, es decir el agua es “retenida” osmóticamente de tal forma que se hace indisponible lo que conduce a un estrés hídrico (sequía fisiológica). Los síntomas del estrés salino son muy diferentes de los provocados por un estrés hídrico. Las plantas con estrés salino se muestran atrofiadas pero turgentes y su aspecto no es marchito a diferencia del estrés hídrico. La planta es capaz de mantener el gradiente osmótico con respecto al medio e incluso puede mejorarlo en condiciones de salinidad moderada. Actualmente el crecimiento reducido de estas plantas no se atribuye a la tensión osmótica, sino a que la

salinidad inhibe la asimilación de nutrientes y agua reduciendo el estado energético de la planta, ocasionado por alteraciones de la membrana celular, especialmente en su permeabilidad, que exigen un mayor consumo de energía metabólica. Otra razón que explica el elevado consumo energético es la eliminación activa del sodio de las células vegetales. Se han descrito procesos de reajuste osmótico, por ejemplo, por la síntesis de sustancias orgánicas osmóticamente activas (aminoácidos y amidas, poliaminas, polioles, antioxidantes y ATPases) que les permiten a algunos cultivos mantener cierto grado de tolerancia a la salinidad (Ashraf y Harris, 2003).

2.3.2 Solutos compatibles

Los osmolitos juegan un papel primordial en el ajuste osmótico necesario en respuesta al déficit hídrico, salinidad o cualquier otro factor que aumente la fuerza osmótica del medio. Estos osmolitos tienen la propiedad de no tener carga neta a pH neutral, y son altamente solubles en agua. Entre los osmolitos más estudiados están: la prolina, polioles y glicinbetaína.

La acumulación de prolina en el citoplasma, es una respuesta metabólica al déficit de agua y a la salinidad, ésta funciona como un aceptor de radicales libres (Smirnoff y Cumbes, 1989). La prolina es altamente soluble, se acumula en hojas de muchas especies halófitas creciendo en ambientes salinos (Briens y Larher, 1982), en los tejidos foliares y meristemos apicales aéreos de plantas que experimentan estrés de agua (Jones y Turner, 1980), en polen bajo desecación; en tejidos radicales expuestos a bajo potencial de agua (Voetberg y Sharp, 1991) y en cultivos celulares adaptados al déficit de agua (Rhodes et al., 1986) y a la exposición al NaCl.

Los mecanismos por los cuales funcionan como osmolitos son: ajuste osmótico y osmoprotección, los cuales son difíciles de separar mecanísticamente. En el oligonucleotidoso actúan como osmolitos o solutos compatibles, facilitando la retención de agua en el citoplasma y permitiendo la segregación del sodio en la

vacuola o el apoplasto. Alternativamente, la protección de estructuras celulares (probablemente por atrapamiento de radicales libres) se consigue por interacción de dichos osmolitos con membranas, proteínas y complejos enzimáticos. En la osmoprotección, la función tiene que ver con sus características químicas únicas que les permiten mantener la estabilidad de macromoléculas bajo condiciones de déficit de agua.

2.3.3 Absorción y compartimentalización de iones

La absorción de iones se da a través de moléculas antiporters Na^+/H^+ , que transportan de manera específica sodio y litio y lo concentran en la vacuola. Los estudios fisiológicos indican que ocurre excreción de Na por parte de la raíz así como la mencionada deposición en las hojas, lo cual indica que la actividad antiporter Na^+/H^+ remueve el Na de los tejidos o lo concentra en las vacuolas. La mayor parte de los resultados que explican los mecanismos y la relación de éste antiporter con las concentraciones salinas en que se encuentra la planta están realizados en mutantes de *A. thaliana*. Las mutantes de Arabidopsis en el gen *sos1* (Salt Overly Sensitive, gen que codifica para antiporters Na^+/H^+) son muy sensibles a niveles altos de Na^+ y niveles bajos de K^+ (Shi et al., 2000).

Otras moléculas involucradas en la sequía fisiológica del estrés salino son las proteínas acarreadoras específicas para el agua (acuaporinas), pertenecientes a la superfamilia de canales protéicos asociados a membranas llamados MIP (Major Intrinsic Proteins). Las acuaporinas (también llamadas canales de agua) facilitan el flujo de agua a través de un gradiente de osmomolaridad, es decir, facilitan el transporte de agua en contra de gradientes osmóticos requiriendo baja energía de activación. El efecto final es la regulación fina del transporte de agua, tanto del espacio apoplástico al citoplasma como de este a la vacuola.

La compartimentalización de iones está estudiada en el modelo de vidrillo (*Mesembryanthemum crystallinum*) y se ha observado que la exposición al sodio da lugar a que se deposite formando un gradiente a lo largo del eje principal de la planta, con mayor concentración en tejidos jóvenes. El vidrillo tiene células

vesiculares epidérmicas preformadas que sirven de almacén de sodio, y que aumentan considerablemente su tamaño cuando la planta está bajo estrés salino. Se ha medido concentración de sodio de hasta 1M dentro de las vacuolas de éstas células (Adams et al., 1992). Como compensación al sodio de las vacuolas, aumenta la concentración de D-pinitol en el citoplasma, manteniendo un equilibrio homeostático. Éste es un mecanismo clave en plantas halófitas que hace la diferencia con el mecanismo de glicófitas. Éstas últimas tratan de limitar la absorción de sodio o bien lo acumulan en los tejidos de mayor edad que, bajo esta condición, funcionan como compartimientos de almacenamiento y son eventualmente sacrificados (Cheeseman, 1988).

2.4. Mejoramiento genético de plantas

La domesticación (modificación genética) de las plantas fue fundamental para el desarrollo de la agricultura, el hombre pudo sostenerse de lo que producía y comenzó a modificar el medio para su beneficio.

El estudio de la bioquímica y la fisiología sobre las plantas, ha brindado información fundamental para su reproducción, el interés radica en las necesidades de alimento, se estima que 40 mil personas mueren cada día por malnutrición. Si bien la revolución verde ayudó en la disminución de este problema, no se a podido acabar con el hambre, debido a factores que disminuyen la producción de alimentos, tales como tierras agrícolas con suelos salinos y cantidad limitada de agua. Existen diversas rutas para llegar a soluciones, nosotros enfocaremos el problema en el planteamiento de un análisis paralelo desde la perspectiva evolutiva y genética. En este sentido surgen algunas interrogantes como:

¿La especie resistente tiene genes que se expresan en repuesta a estrés salino?,
¿Por qué los mecanismos moleculares y bioquímicos que operan en la variedad resistente no se manifiestan en las variedades sensible?, ¿La expresión de genes en especies resistentes corresponde a genes ancestrales que se seleccionaron en

estas especies resistentes pero no en las especies sensibles, o se trata de genes adquiridos durante la evolución que permitieron a determinadas especies la colonización de otros hábitats?.

La aplicación de la genómica mediante la identificación y manipulación de genes puede ayudarnos a dilucidar los mecanismos bioquímicos y fisiológicos operantes en las situaciones de estrés e incrementar los rendimientos. Estas tecnologías pueden apoyar en la búsqueda de solución a problemas que afectan la adaptación y la productividad en los principales cultivos agrícolas. Por fortuna la producción de cultivos genéticamente modificados no es una tecnología compleja y está al alcance de la mayoría de los países en desarrollo (Pimienta E. et al., 2006).

2.5. El genero *Capsicum* como modelo de estudio

El chile *C. annum*, (figura 2, panel A) es la variedad mas ampliamente conocida y de mayor importancia económica de los chiles cultivados ya que se distribuye mundialmente (Pickersgill,1969). Es además la especie que presenta la mayor variabilidad en las características vegetativas, en forma, tamaño y color de los frutos (IBPGR, 1983; Laborde y Pozo, 1982; Pozo et al., 1991). *C.annuum* var. *glabriusculum* (figura 2, panel B) es considerada como el progenitor silvestre de la especie domesticada (Pickersgill,1971, Hernández 1999), se encuentra ampliamente difundida en toda la zona costera del país desde Sonora a Chiapas por el Pacífico y de Tamaulipas a Yucatán y Quintana Roo por el Golfo de México en donde recibe un sin número de nombres locales, entre los que sobre sale los de “chiltepín”, “chile piquín”, o “de monte” (Laborde y Pozo, 1982). Las poblaciones de *C.annuum* var. *glabriusculum* se encuentran bajo árboles de la selva baja caducifolia (Hernández et al. 1999). El chiltepín crece en Baja California Sur donde la mayor parte de la selva baja caducifolia de la zona se asienta en condiciones de estrés hídrico (condiciones de menor humedad que

tienen que soportar las plantas) por sus bajas precipitaciones y altas temperaturas (Trejo, 1999).

Hernández en el 2002 estudio la estructura y variación genética entre poblaciones silvestres y domesticadas de *C.annuum* para evaluar la resistencia a germinivirus PHV dentro especies y entre poblaciones encontrando mayor resistencia en las especies silvestres. Lo que nos lleva a observar que las distintas variedades de chiles, aún perteneciendo a la misma especie, presentan diferentes umbrales de tolerancia a diversos factores bióticos y abióticos,

Los parientes silvestres de las plantas cultivadas son un valioso acervo genético que puede ayudar a entender los procesos bioquímicos y moleculares; así como a la solución de problemas en agricultura. (Harlan 1976; Stalker 1980; Burdon y Jarosz,1989).



Figura 2. Morfología del chile poblano *C. annuum* var. *annuum* (panel A) y *C.annuum* var. *glabriusculum* (panel B).

III. HIPÓTESIS

El chile chiltepín (*Capsicum annuum* var. *Glabriusculum*) está adaptado fisiológica y morfométricamente para ser más resistente a la salinidad, por lo que posee genes que se activan en respuesta al estrés salino, mientras que la expresión de estos genes no se inducen en chile poblano (*Capsicum annuum* var. *annuum*) sometido a estrés salino.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar por parámetros fisiológicos y morfométricos la resistencia a salinidad de *C. annuum* var. *Glabriusculum*, identificar los genes involucrados, y evaluar la expresión de algunos de ellos en una especie emparentada sensible a la salinidad (*C. annuum* var. *annuum*).

Objetivos Particulares

Evaluar por parámetros fisiológicos y morfométricos la resistencia a la salinidad de *C. annuum* var. *glabriusculum* y *C. annuum* var. *annuum*

Identificar los genes expresados diferencialmente en *C. annuum* var. *glabriusculum* en respuesta al estrés salino.

Evaluar la expresión de genes de *C. annuum* var. *glabriusculum* y *C. annuum* var. *annuum* en respuesta a estrés salino mediante un arreglo molecular de genes.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Bioensayo de estrés salino

Todos los bioensayos se realizaron utilizando los germinados de las semillas de *C. annuum* var. *glabrisculum* (chiltepín) y *C.annuum* var. *annuum* (poblano). Se desinfectaron en una solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos. Después las semillas se sumergieron en agua durante 3 horas y se colocaron aproximadamente 25 semillas en una caja Petri que tiene como sustrato algodón saturado con agua estéril, se incubaron en una cámara de germinación (Yamato Ltd, con controlador de temperatura y humedad relativa) para dar las condiciones de temperatura de 25 ± 2 °C en condiciones de oscuridad de 12 h y 12 h de luz. Tres semanas después de la germinación, las plántulas se transfirieron a semilleros con sustrato peatt-moss, se dejaron en desarrollo 8 semanas, y diariamente se regaron con la solución nutritiva de Hoagland y Snyder (Hewit, 1963).

Para cumplir los objetivos de la tesis, se realizaron un total de 3 bioensayos, El primero para estudios de fisiología y el segundo para estudios de identificación y expresión de genes.

El bioensayo uno, se realizó con la finalidad de obtener muestras para la respuesta fisiológica de chiltepín y chile poblano al estrés salino. Consistió en colocar las plantas en macetas con sustrato peatt-moss. Se utilizaron 15 plantas de chiltepín de tamaño homogéneo y 15 plantas de chile poblano de tamaño homogéneo.

Las plantas se regaron con la solución nutritiva complementada con diferentes concentraciones de NaCl (50mM, 100mM, 200mM, 300mM). Se trabajaron 5 lotes (un control y cuatro tratamientos) para chiltepín y para chile poblano con 3 plantas cada lote. El lote control se regó con 100 ml de solución nutritiva de Hoagland y Snyder (Hewit, 1963). El segundo lote se sometió a estrés salino

una solución de NaCl 50mM, el tercer lote con una solución de NaCl 100mM, el cuarto lote con una solución de NaCl 200mM y el

quinto lote con una solución de NaCl 300mM. El bioensayo se realizó por 30 días regando cada maceta diario con 100 ml de la solución correspondiente.

El segundo bioensayo, sirvió para estudiar la expresión diferencial de genes de chile Chiltepín ante el estímulo salino. El bioensayo consistió en someter tres planta de chiltepín a diferentes tratamientos: planta control, regada con 100 ml solución nutritiva de Hoagland Tratamiento A, planta sometida a NaCl 300 mM y muestreada a los 30 minutos; Tratamiento B, planta sometida a NaCl 300 mM y muestreada a las 24 h. Los tiempos de muestreo se seleccionaron en base a lo publicado por Shinji Kawasaki et al., 2001, en donde reporta que los perfiles de expresión de genes tempranos son a los 15 minutos y los de expresión tardía hasta meses después del estímulo.

El tercer y último Bioensayo se realizó para el análisis de expresión de genes de chile poblano ante el estímulo salino, mediante la herramienta de macroarreglos de ADN. El bioensayo consistió en someter tres planta de chile poblano a diferentes tratamientos: planta control, regada con 100 ml solución nutritiva de Hoagland Tratamiento A, planta sometida a NaCl 300 mM y muestreada a los 30 minutos; Tratamiento B, planta sometida a NaCl 300 mM y muestreada a las 24 h.

5.2 Evaluación de parámetros fisiológicos en respuesta al estrés salino.

La investigación del desarrollo y componentes de las plantas sometidas por 30 días a estrés salino se realizó en el laboratorio de Fisiotecnia vegetal del CIBNOR y en las instalaciones del CIBNOR en Guerrero Negro siguiendo la metodología que se describe abajo:

5.2.1 Transpiración, humedad relativa, temperatura y radiación

Se empleó un porómetro de estado estable (LI-1600, LICOR) este equipo nos permite obtener datos sobre parámetros fisiológicos como humedad relativa, temperatura, transpiración y radiación. Este estudio se realizó en la planta viva en la maceta, la lectura de datos se hizo en horas frescas de la mañana (10 a 11

h) y en las hojas con mayor actividad fotosintética localizadas en la tercera hoja a partir del punto de crecimiento de la planta.

5.2.2 Clorofila a, b y total

Para el análisis de clorofila a, b y total se procedió de acuerdo al método de Amon (1949), se tomaron muestras de hojas de plantas (vivas) y se realizó la extracción de pigmentos con una solución de acetona al 80%. El registro de estos valores se realizó en todos los extractos utilizando un espectrofotómetro (Aquamate modelo Spectronic) a 645 y 665 nm de longitud de onda.

En las siguientes evaluaciones se separó de cada planta tallo, hoja, raíz y suelo, donde se analizó tanto materia fresca como materia seca.

5.2.3 Área foliar

Este parámetro nos permite evaluar el crecimiento de la planta, en esta parte se evalúa las hojas como materia fresca, se utilizó un medidor de área foliar (Modelo LI-3000 A, LICOR) para obtener información sobre el número y tamaño de las hojas. Enseguida se pesaron en una balanza analítica tallos, raíz y hojas frescas para cada planta. Se midió la altura de los tallos y las raíces de cada planta.

Posteriormente se pusieron a secar a 80°C por 24 h en un horno de flujo de aire caliente forzado con control de temperatura (Shel Lab) y se tomaron valores para cada una de las plantas: peso y altura (para tallo y raíz) y peso para hoja.

5.2.4 Análisis minerales

Para el análisis de los minerales de K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} y P se realizó una extracción con mezclas de ácidos a partir de materia seca de suelo, hoja, tallo y raíz y se analizó con un espectrofotómetro de absorción atómica y de flama (Shumadzu AA-660). Para los aniones Cl^- y NO_3^- se realizó una extracción con agua caliente y se analizó por cromatografía de iones. Para todos los parámetros mencionados se realizó un análisis estadístico con el paquete SPSS 15.0 para Windows para cada lote con sus replicas.

5.3 Evaluación de la expresión de genes de chiltepín y chile poblano, en respuesta a estrés salino.

La evaluación de expresión de genes, se realizó mediante la técnica de macroarreglos (descrita en el punto 5.4). Los genes a evaluar se obtuvieron mediante 2 técnicas: Despliegue diferencial de chiltepín bajo estrés salino y Amplificación de genes de chiltepín bajo estrés salino usando oligonucleotidos específicos, obtenidos de un banco de genes sustractivo (SSH) de *C. annuum* tipo Guajillo.

5.3.1. Expresión diferencial de genes de chiltepín bajo estrés salino, mediante Despliegue diferencial (DD).

Para la obtención de genes expresados diferencialmente se utilizó la técnica de DD, que permite observar de manera rápida las diferencias en los patrones de expresión de genes entre plantas control y plantas sometidas a estrés salino.

5.3.1.1 Extracción de ARN

Se aisló ARN total empleando el protocolo de TRI PURE (Invitrogen), formulado con una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina, para mejorar la calidad e integridad del ARN se utilizó nitrógeno líquido durante la extracción (ver anexo 1 para el protocolo detallado).

La integridad del ARN total se confirmó por electroforesis en gel de agarosa-formaldehído al 1%, libre de ARNs y se cuantificó espectrofotométricamente utilizando un NANODROP (1000 thermocientific) a longitud de onda de 260nm. Las bandas de ARN se visualizaron tiñendo con SYBER SAFE (Invitrogen) y exponiendo a luz UV.

5.3.1.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para la síntesis del ADNc se utilizó la transcriptasa reversa Sensiscript™ (QIAGEN) en base a lo recomendado por Irene Bosch, et al. 2000. La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 µl, conteniendo 2 µl de bufer 10X, 2 µl de dNTPs 20 mM, 10 U de inhibidor de ARNsas, 1 µl del oligonucleotidos APG 20

μ M, 50 ng de ARN, 1 μ l de la transcriptasa reversa sensiscript. La mezcla se incubó por 60 minutos a 37°C. Para la síntesis de cDNA se empleó el oligonucleótido de anclaje APG (Clontech, GeneHunter) cuya secuencia es 5'-AAGCTTTTTTTTTTGG-3'.

La calidad del ADNc se comprobó mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) utilizando los oligonucleótidos del gen ribosomal 18S:

V18SF (5'-GGGCATTCGTATTTTCATAGTCAGAG-3')

V18SR (5'-CGGTTCTTGATTAA TGAAAACATCCT'-3').

Los amplicones se observaron por electroforesis en geles de agarosa al 1% y teñidos con SYBR Safe, utilizando el marcador de peso molecular 1 Kb Plus (Invitrogen).

5.3.1.3 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando el kit Advantage® 2 PCR, el oligonucleótido de anclaje APG (5'-AAGCTTTTTTTTTTGG-3') y los oligonucleótidos aleatorios descritos en la tabla I (ver anexo 2 para el protocolo detallado).

Tabla I. Secuencia de oligonucleótidos aleatorios utilizados en la técnica de DD.

NOMBRE	SECUENCIA	Tm (°C)
RP1	5'-AAGCTTGATTGCC-3'	45.8
RP2	5'-AAGCTTCGACTGT-3'	41.0
RP3	5'-AAGCTTTGGTCAG-3'	41.9
RP4	5'-AAGCTTCTCAACG-3'	42.2
RP5	5'-AAGCTTAGAGGCA-3'	42.1
RP6	5'-AAGCTTGCACCAT-3'	46.1
RP7	5'-AAGCTTTCATATG-3'	34.5
RP8	5'-AAGCTTTCATATG-3'	41.6

5.3.1.4 Electroforesis y tinción de los productos amplificados

Los productos de PCR fueron analizados en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (Urea 6%) teñidos con nitrato de plata. Posteriormente el gel fue secado y examinado, con la finalidad de detectar el despliegue diferencial de bandas (amplicones). Los amplicones seleccionados (genes cuya expresión fue inducida o reprimida), fueron cortados del gel para su elusión. (Ver anexo 3 para el protocolo detallado).

5.3.1.5 Elusión de amplicones, clonación y secuenciación

Los amplicones fueron ligados en el vector pGEM-T (Promega) y clonados en *Escherichia coli DH5 α* (Sambrook et al., 1989). Los plásmidos fueron extraídos mediante la técnica de Mini preps. A partir de los plásmidos se determinaron la secuencias nucleotídica de los inserto de cDNA de cada clona (genes expresados diferencialmente), utilizando los oligonucleotidos universales del vector de clonación (M13F y M13R). (Ver anexo 4 para el protocolo detallado).

5.3.2 Amplificación de genes usando oligonucleotidos específicos, obtenidos de un banco de genes sustractivo de Chile

Usando 19 oligonucleotidos específicos (Tabla II), obtenidos de un banco de genes sustractivo (SSH) de *C. annuum* tipo Guajillo, los cuales fueron donados por una colaboración con el Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT) se procedió a la amplificación de genes de ambas variedades de Chile.

Tabla II Lista de Oligonucleotidos empleados para amplificar genes de chiltepín y poblano en control y los dos tratamientos.

Nombre Oligonucleotidos	Gen	Secuencia	
		Sentido	
		Antisentido	
Esterase	Esterasa del chile	5' TGACACAATTGTACGTAAACCTG 3'	5' CTCAATTGCATGA TAACCATCTC 3'
StressRip	Proteína de estrés- maduración	5' ATAGTCATAATAGTCACT ATGGCA 3'	5' AGCAACACTATATAATACAAGGTAG 3'
Omedesat	Omega Desaturasa	5' AAGTCATCTGCAAAGAGTTCCAT 3'	5' AGTAAGTGGCTGCTAGATAATAAGT 3'
CCoAOMT	Caffeoil-CoA O metiltransferasa	5' CAAGAGTATAATCGACTATGTCAAGC 3'	5' CTGGAAGCTGGCAAATTTTCGAT 3'
Acetsynt325	Acetolactato sintasa	5' ACATCTGGTGGATTAGGAGCAAT 3'	5' CCAAGTGTTGATTATTCAGCAACA 3'
GD1	Inhibidor de la disociación GDP	5' TGTCTCAACAGAGGCAGAAACT 3'	5' ACATCGTCTACAGTCGACTCAA
TMV Ind Prot	Proteína inducida por TMV- 1	5' CACAGCTTATGTCCGAACTG 3'	5' ACGGTGMCGATTGGTGCAA 3'
MADSbox	Factor de Transcripción de la caja MADs	5' TAAGGAGATGGTGAGAGGGA 3'	5' GAGCTGGCAAATTTCTAGAGCT 3'
Annexin	Anexina	5' CAAGTCTAACCGTTCCAGCA 3'	5' GTAAGTTCTCTGTCCAACCTTTT 3'
PHI2	Factor de transcripción inducido por fosfatos-2	5' GACCGATGAATATGGATGACTT 3'	5' CAGTCTCACATCTATCATTAGC 3'
LPX	Lipoxigenasa	5' AGCTCTCACTTGGACTATTCCT 3'	5' TGATAGGATTAACCTCCAGCTAGCA 3'
Ala	Alanina aminotransferasa	5' AGTGACATGCAATAGAGCAGA 3'	5' GTCCTTACTGTTCTGACTATAGA 3'
DEA	DEA1	5' TCTCTCTTGTGAGTGCATGTG 3'	5' GATTTCCAAGTACAACCTCCAAG 3'
Samdc	S-adenosil metionina dexcarboxilasa	5' TAGCCTCTTTGTCTACTCTTACAA 3'	5' AGAAGTACTGGATGGGTATG 3'

ER1PRINH	Subunidad α de E1 de la piruvato deshidrogenasa	5' GCAAAGA TGTCTATGGTGAAGTT 3'
		5' AGCGAACTTCGCTGGTGTT 3'
EPOXHYD	Epoxido Hidrolasa	5' TACCTGGTTCACCTGAAGAAGAT 3'
		5' GTCATATGCACCAAACCTTAAG 3'
Thaumatina	Thaumatina	5' GTGACTT ACACTT ATGCTGCCA 3'
		5' TGAGTGMCCAGGGCATTCA 3'
SesqCycla 316	No identificado	5' ATGGCCTCAGTTGCAGTTGAA 3'
		5' GATGCTAACAACATACTCCTTGT 3'
Nir 3	Nitrato reductasa	Secuencia no disponible
		Secuencia no disponible

5.3.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa

Se utilizaron 4 μ l de ADNc de chiltepín y de chile poblano como templado. Para cada uno de los oligonucleotidos de la tabla 2. La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, (Ver anexo 5 para el protocolo detallado).

Con variaciones en la temperatura de alineación (T_m), siendo éstas de 59°C (para todos los 19 juego de oligonucleotidos de la Tabla II), 53°C y 48°C (para los que no amplificaron a 59°C). Los amplicones se analizaron en geles de agarosa al 1%, teñidos con SYBR Safe (Invitrogen) y los tamaños de las bandas se comprobaron con el marcador de peso molecular 1 kb plus (Invitrogen). Las concentraciones de ADN se determinaron por espectrofotómetro, utilizando Nanodrop (ND-100) y se ajustó la concentración final a 300 ng/20 μ l para ser inmovilizadas en el arreglo.

5.3.2.2 Anotación de genes en base de batos

El ADNc plasmídico de los clones obtenidos se envió a la empresa "MacroGen" (Seoul, Korea) para obtener su secuencia nucleotídica. Posterior a la recepción de los archivos de secuenciación, para determinar su calidad (además de analizar el archivo cromatográfico). Se identifico la secuencia de los oligonucleótidos pertinentes (o el reverso complementario de estos), así como la secuencia de los extremos del vector pGEM-T; para determinar así la EST (secuencia del ADNc) de cada clon, a las secuencias se les identifico el reverso

complementario, se les determino la secuencia complementaria directa. Después de procesar todas las secuencias e identificar la EST, se realizo un análisis de alineamiento con secuencias de un banco de genes sustractivo (SSH) de *C. annuum* tipo Guajillo, los cuales fueron enviadas por el Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICyT). Además de un análisis de secuencias con el programa para búsqueda de alineamiento local básico "BLAST" del Centro Nacional de Información Biotecnológica "NCBI", para inferir función.

5.4 Evaluación de la expresión diferencial de genes de chile chiltepín y chile poblano mediante la técnica de Macroarreglos

Esta técnica se utilizó para evaluar la expresión de genes obtenidos por DD de chiltepín y genes seleccionados de un banco de genes sustractivo de chile, utilizando como sonda ADNc de chile Poblano de cada tratamiento y control marcado con digoxigenina.

5.4.1 Preparación de la sonda

El ARN se obtuvo a partir de hojas del bioensayo para análisis de expresión de genes de chile poblano mediante macroarreglos en el punto 5.1.

Se prepararon 3 sondas por separado (una para control, y dos más para tratamiento A y B). La reacción se llevó a cabo utilizando la transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen) y el marcaje se realizó utilizando deoxiribonucleótidos con DIG-11-dUTP 1 mM (Roche), (ver anexo 6 para el protocolo detallado).

5.4.2 Cuantificación de la sonda por quimioluminiscencia.

La eficiencia de la incorporación de digoxigenina a la sonda se evaluó por quimioluminiscencia y se ajustó la cantidad de cada sonda necesaria para la hibridación. (Ver anexo 7 para el protocolo detallado).

5.4.3 Inmovilización del ADN a la membrana

Para la fijación de los productos de PCR de cada uno de los genes obtenidos tanto del despliegue diferencial como la amplificación usando oligonucleotidos específicos, se prepararon todos productos de PCR en concentración de 300 ng/10 μ l. Se fijaron 1 μ l de ADN en cada posición y cada gen se imprimió por duplicado en tres membranas (Control, Tratamiento A y Tratamiento B) de Nylon Hybond, utilizando el equipo BioOdyssey Calligrapher mini Arrayer. Una vez absorbido el ADN en las membranas, se incubaron por 2 min., en una solución de NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M para desnaturalizar el ADN, posteriormente se neutralizaron por 5 min., en NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M, pH 8. Las membranas se lavaron 30 seg., en una solución Tris-HCl 0.2 M, pH 7.5, Buffer SSC 2X. El exceso de humedad fue removida colocando un papel filtro y por último se fijo el ADN con UV a 300 m Joules en un CL 1000 ultravioleta Crosslinker VVP.

5.4.4 Hibridación

Una vez teniendo los productos de PCR inmovilizados en la membrana ésta se pre-hibridó en un horno de hibridización (VWR) a 65°C durante 1 h con agitación constante. La sonda se desnaturalizó colocándola durante 5 min en agua hirviendo e inmediatamente después se colocó en hielo para evitar que la sonda se renaturalice. Terminada la hora se agrego de nuevo solución de hibridación pero esta vez con la cantidad de sonda calculada y se hibridó a 65°C durante 16 hrs. Posteriormente se le hicieron lavados post-hibridación para seguir con el proceso de detección. (Ver anexo 8 para detalles de protocolo).

5.4.5 Detección por quimioluminiscencia

El revelado se realizó siguiendo el protocolo recomendado para la detección con el sustrato quimioluminiscente CDP-Star, ready-to-use (Roche). Posteriormente las membranas fueron reveladas en una película Lumi chemiluminiscent detection film (Roche) en oscuridad por 20 min. Para su posterior revelado (con la solución Kodak GBX Developer and repleisher, Kodak) y fijado (solución Kodak GBX fixer and repleisher, Kodak).

Las películas se observaron en un transiluminador de luz visible y se documentaron utilizando el sistema EDAS 190 (Kodak). (Ver anexo 9 para el protocolo detallado).

5.4.6 Cuantificación de la cantidad de ARNm

Para cuantificar los niveles de ARNm de cada uno de los genes, se procedió a utilizar el programa ID Image Analysis Software de Kodak donde la Intensidad de cada una de las manchas fue utilizada para comparar los niveles de expresión de los genes en cada tratamiento.

VI. RESULTADOS

6.1 Evaluación del porcentaje de germinación

El porcentaje de germinación para chiltepín, después de 15 días fue de 22 semillas germinadas, lo que representa un 10% de germinación (de un total de 250 semillas). En el caso del porcentaje de germinación de chile poblano, se obtuvieron 45 semillas germinadas de un total de 50. Las plantulitas se trasplantaron a una charola con sustrato y se dejaron crecer por aproximadamente dos meses después se cambiaron a bolsas negras con mayor espacio y cantidad de sustrato; se dejaron por otros dos meses y finalmente se pasaron a las macetas, se seleccionaron las que tuvieran un tamaño similar. Se mantuvieron dos semanas en acondicionamiento antes de comenzar el bioensayo.

6.1.2 Evaluación de la resistencia al estrés salino 30 días / NaCl

Las macetas con las plantas se acomodaron en lotes de tres para cada variedad y se separaron en 5 hileras que representaban las concentraciones de salinidad. Se procedió conforme a la metodología (5.1) y a los 30 días se hicieron las evaluaciones de transpiración, área foliar, peso seco y fresco de hoja, raíz y tallo, así como el análisis de clorofilas y minerales.

La Fig. 3 muestra las diferencias que existen entre las plantas control y las diferentes concentraciones de salinidad. Observamos un fuerte cambio en la tendencia en disminución de crecimiento del chile poblano así como un color más intenso en el verde de las hojas de la concentración de 300 mM (En los resultados de clorofila discutiremos más este punto). El chile poblano presentó síntomas visuales del daño por la salinidad en el follaje los cuales se fueron acentuando con el paso del tiempo, principalmente en los tratamientos con mayor concentración de NaCl por el efecto osmótico del NaCl. En el Chiltepín se aprecia que el tamaño de la planta no se ve afectado.

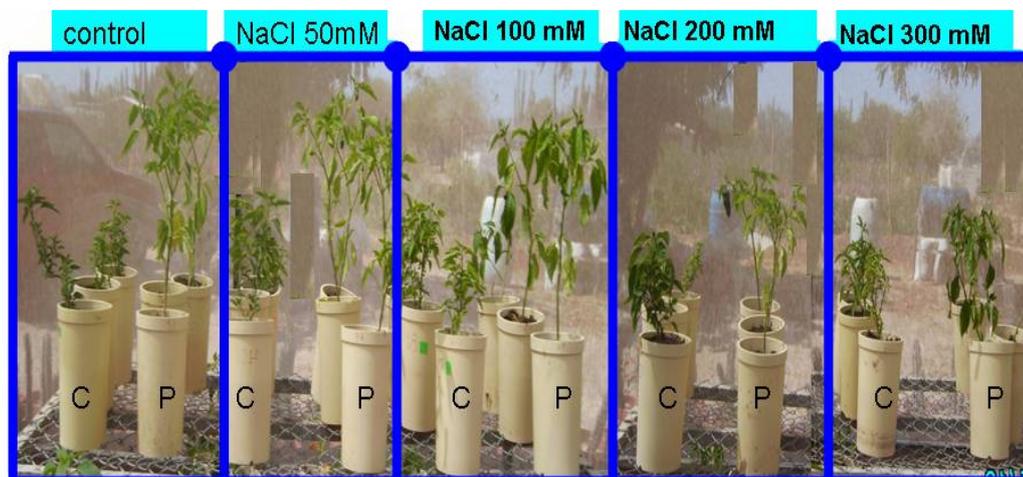


Figura 3. Acomodo de las plantas para el bioensayo. (C) es para la variedad de chiltepín y (P) para la variedad de poblano, después de 30 días con los diferentes tratamientos de NaCl.

6.1.3 Transpiración

Los resultados de nuestros análisis mostraron una disminución estadísticamente significativa ($P > 0.05$) en la tasa de transpiración ($\text{mol de H}_2\text{O cm}^{-2}\text{s}^{-1}$) para la variedad de chiltepín. La inhibición se observó desde la oligonucleotidosa concentración (50 mM) con una tendencia a mantenerse pese al aumento de salinidad. La transpiración en la variedad de poblano disminuye hasta 100 mM pero a 200 mM se observa un cambio muy significativo a aumentar la tasa de transpiración volviendo a disminuir en la de 300 mM e incluso la transpiración en este tratamiento es menor que la del control. (Fig. 4).

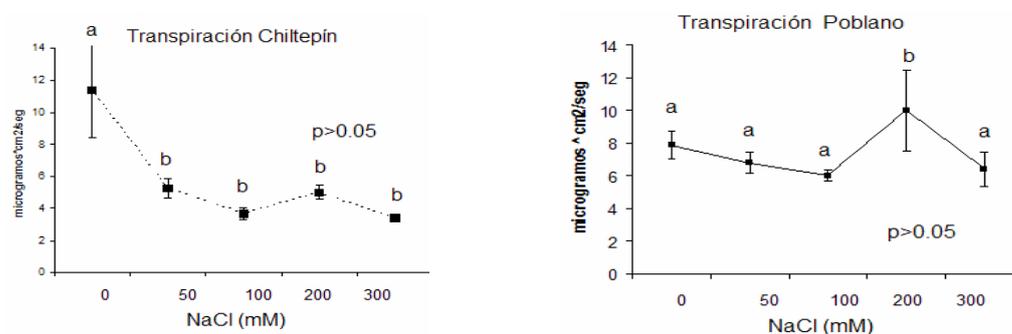


Figura 4. Tasa de transpiración ($\text{mol de H}_2\text{O cm}^{-2}\text{s}^{-1}$) de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (A) y *Capsicum annuum* var. *annuum* (B) bajo diferentes concentraciones de salinidad.

6.1.4 Clorofilas

Los resultados obtenidos para la variedad de chiltepin presentan una tendencia a disminuir los valores conforme aumenta la concentración de NaCl, no existe diferencia significativa entre el grupo control y los tratamientos. Los resultados obtenidos para la variedad de poblano muestran una tendencia a disminuir los valores conforme aumenta la concentración de NaCl sin embargo en la concentración de 300 mM vemos en la Fig. 5 un fenómeno diferente, las clorofilas aumentan sus valores.

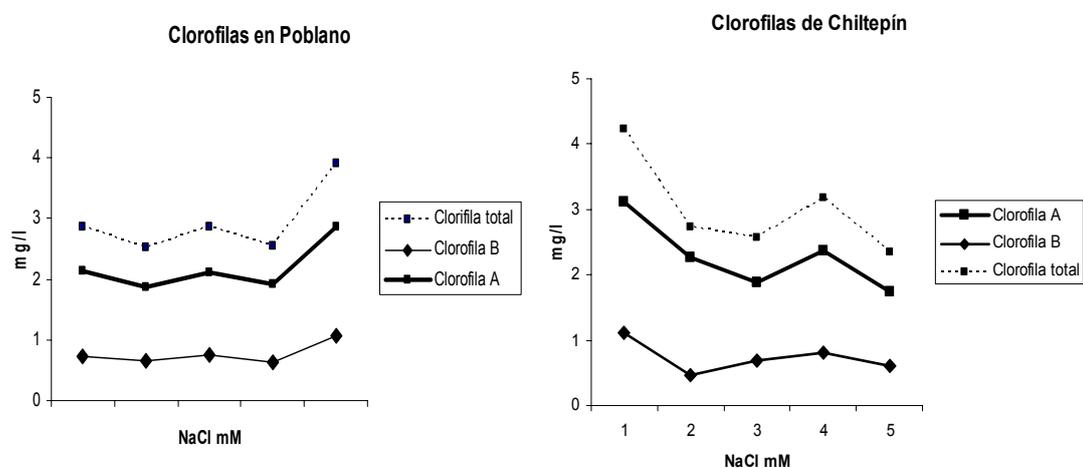


Figura 5. Contenido de clorofila a, b y total de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* y *Capsicum annuum* var. *annuum* bajo diferentes concentraciones de salinidad.

6.1.5 Área foliar y número de hojas

El medidor de área foliar es un equipo que nos ayuda a contar el número de hojas y mide las dimensiones de cada una. Los resultados obtenidos con este equipo nos muestran que el chiltepín en la concentración de 100mM tiene un aumento en el número de hojas al igual que en las dimensiones de las hojas. En los otros tratamientos 200 y 300 mM el número de hojas disminuyó solo un 14% con respecto al control. Respecto al área foliar, ésta aumentó en todos los tratamientos con respecto al control, es decir las hojas que se mantuvieron en el dosel crecieron o se desarrollaron más que en el control. Los análisis estadísticos en la variedad de chiltepín no arrojaron diferencias significativas entre los grupos y el control (Fig.6). Los resultados obtenidos para la variedad de poblano muestran que el número de hojas disminuyó conforme se fueron aumentando las concentraciones de NaCl. En la concentración de 100mM hubo un aumento en área foliar pero bajó en 200 mM y 300mM (Fig.7).

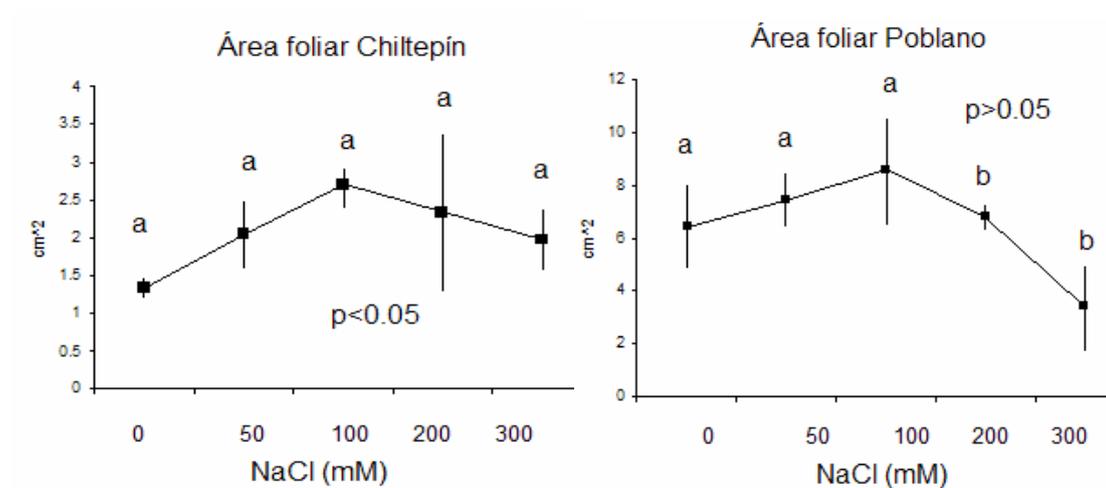


Figura 6. Área foliar de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* y *Capsicum annuum* var. *annuum* bajo diferentes concentraciones de salinidad.

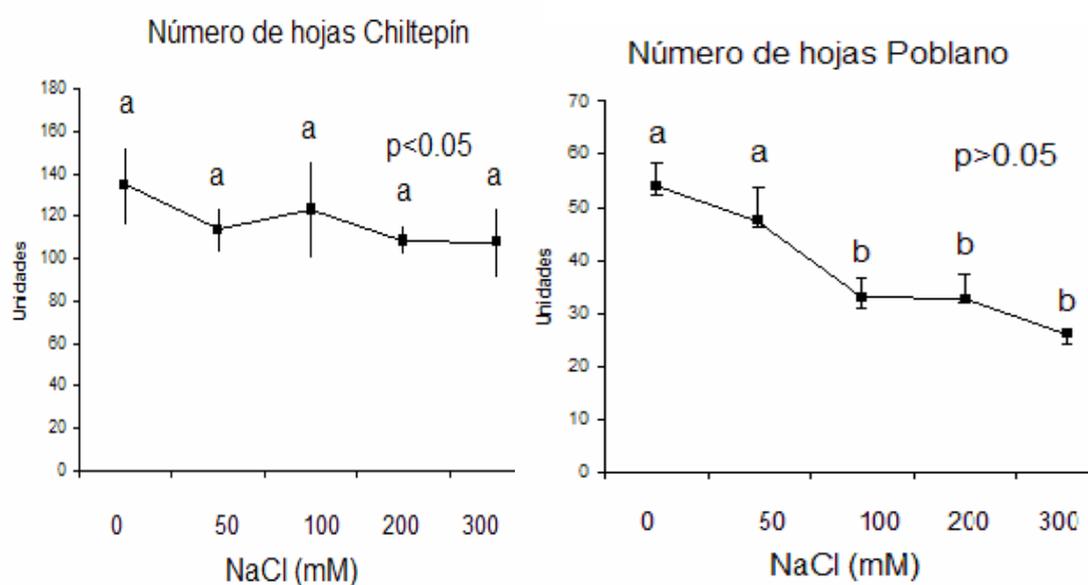


Figura 7. Número de hojas de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* y *Capsicum annuum* var. *annuum* bajo diferentes concentraciones de salinidad.

6.1.6 Peso fresco y seco de hoja

Las evaluaciones para este parámetro nos muestran que el chiltepín tiene un aumento en el peso fresco de la hoja sobre todo a la concentración de 100 mM y aunque disminuye un poco a 200mM y 300 mM estas son más altas que el control. Caso contrario en el poblano donde la tendencia fue a disminuir su peso fresco conforme aumentaron las concentraciones de salinidad. (Fig. 8).

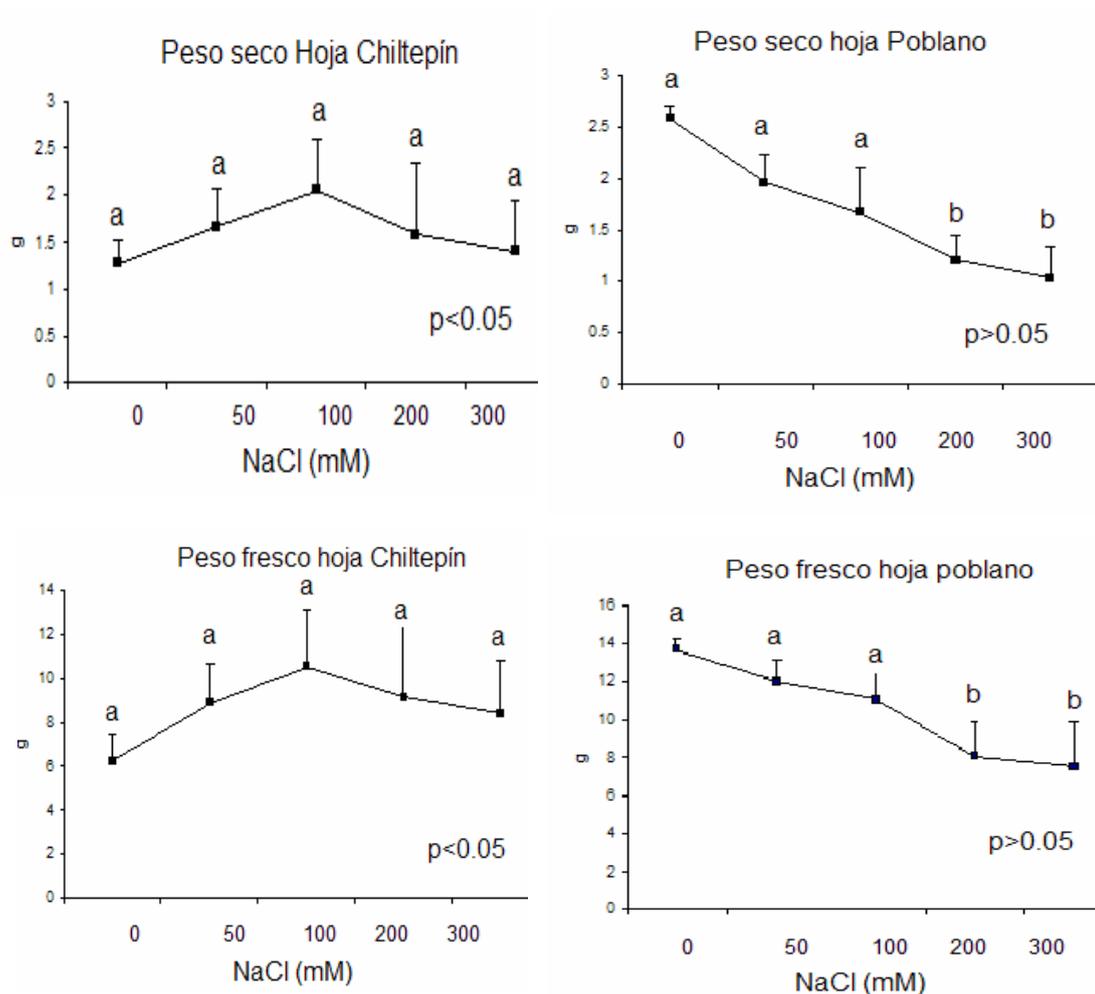


Figura 8. Peso Seco (Arriba) y peso Fresco (abajo) de las hojas de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* y *Capsicum annuum* var. *annuum* bajo diferentes concentraciones de salinidad.

6.1.7. Peso fresco y seco de raíz

Los resultados obtenidos en la variedad chiltepín estadísticamente no muestran diferencias significativas y en las graficas podemos observar tanto en peso seco como en peso fresco los valores de la raíz aumentan en comparación al valor de la raíz control. Caso contrario el obtenido en la variedad de poblano donde los valores decrecen conforme aumenta la concentración de salinidad (Fig.9).

6.1.8 Peso fresco y seco de tallo

Morfológicamente y estadísticamente los resultados de estas evaluaciones nos mostraron una disminución estadísticamente significativa del tallo para la variedad de poblano, contrario en la variedad de chiltepín en la que el tallo mostró un aumento en el crecimiento (Fig.10).

En este estudio, el estrés salino ocasionó la reducción significativa del crecimiento de raíz, tallo y hojas en chile poblano mientras que en chiltepín el crecimiento de estos órganos no fue afectado. Inclusive cuando se utilizó el Índice de Crecimiento Relativo (ICR) como parámetro de comparación se encontró que el crecimiento de raíz, tallo y hojas en chile chiltepín fue estimulado por el estrés salino (Tabla III).

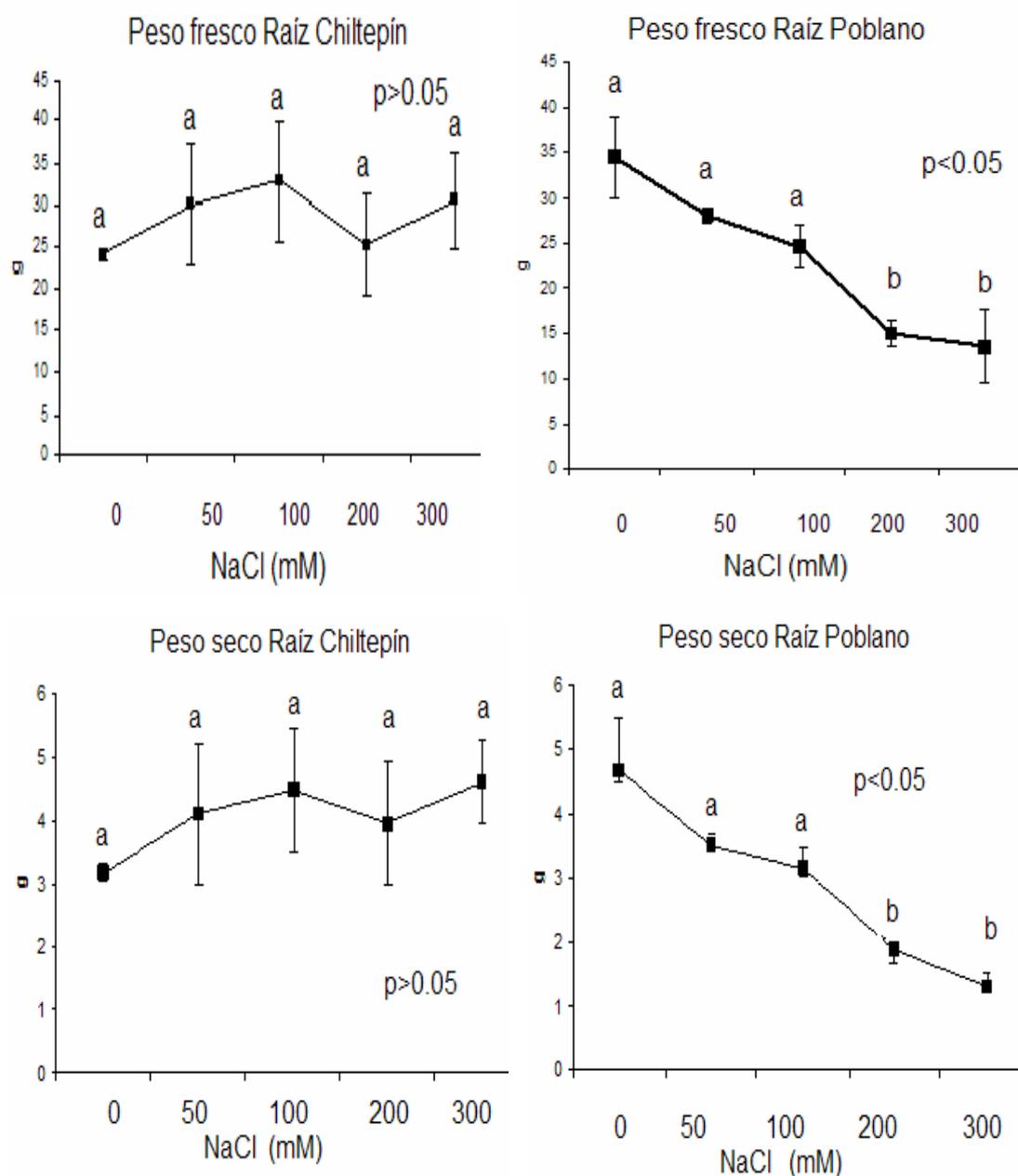


Figura 9. Peso fresco (Arriba) y peso seco (Abajo) de la raíz de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* y *Capsicum annuum* var. *annuum* bajo diferentes concentraciones de salinidad.

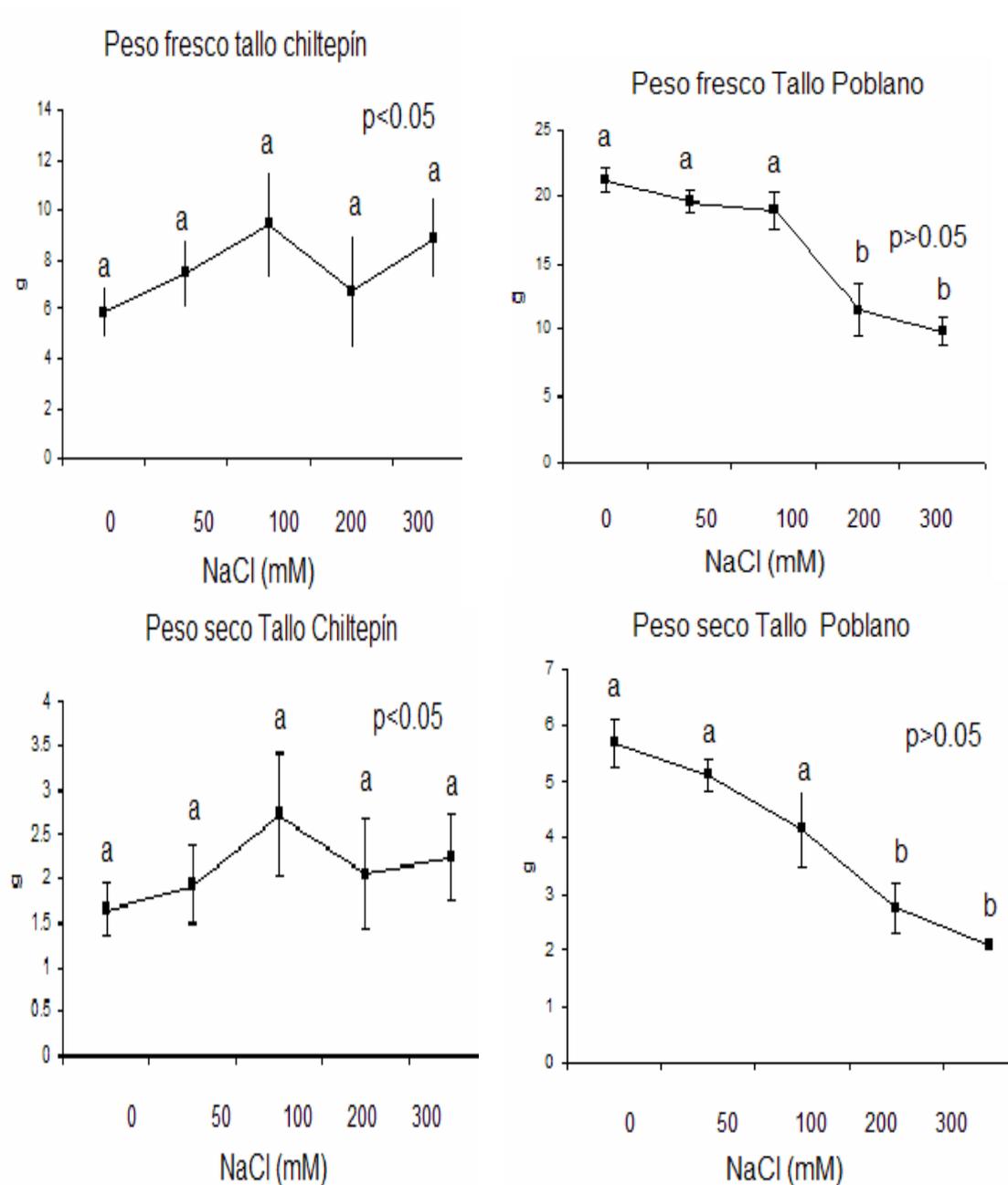


Figura 10. Peso fresco (Arriba) y peso seco (abajo) del tallo de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (A) y *Capsicum annuum* var. *annuum* (B) bajo diferentes concentraciones de salinidad.

Tabla III. Efecto de la salinidad inducida por NaCl en el índice de crecimiento relativo (ICR) del peso seco de partes vegetales. Los valores son el promedio de tres repeticiones.

Variedad	NaCl (mM)	ICR		
		Raíz	Tallo	Hoja
Poblano	0	100 a	100 a	100 a
	50	80 ab	91a	75 a
	100	73 ab	75 ab	87 a
	200	42 b	48 b	70 a
	300	35 b	37 b	26 b
Chiltepín	0	100 a	100 a	100 a
	50	128 a	118 a	132 a
	100	140 a	197 a	196 a
	200	94 a	133 a	228 a
	300	122 a	161 a	178 a
Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas para $p < 0.05$ de acuerdo a la prueba de Tukey.				
ICR= Peso en tratamiento salino*100/peso en control				

6.1.9 Análisis minerales

6.1.9.1 Contenido de cationes calcio, magnesio, potasio y sodio.

En la Tabla IV se muestran algunas relaciones iónicas que se determinaron en hojas, tallo y raíz de las especies evaluadas. De manera general fue encontrado que en las dos especies, las relaciones del Ca^{2+} , Mg^{2+} y K^+ con respecto al Na^+ disminuyeron significativamente con la salinidad.

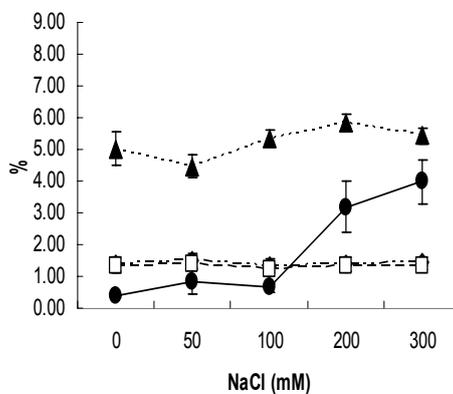
En chiltepín, el contenido de Na^+ se elevó gradualmente con el incremento de la concentración de NaCl en los tratamientos, pero a partir de 200 mM de NaCl se observó que la acumulación de Na^+ en las hojas se incrementó significativamente. La acumulación de Na^+ en las hojas del chile poblano no fue excesiva. En contraste, en chiltepín la acumulación de Na^+ en las hojas fue mayor (Fig.11). El contenido de Na^+ en las hojas del chile poblano no mostró variaciones significativas hasta una concentración de 200 mM de NaCl manteniéndose a niveles considerados que no causan daños por toxicidad. En chiltepín, el contenido de Na^+ se elevó gradualmente con el incremento de la concentración de NaCl en los tratamientos, pero a partir de 200 mM de NaCl se observó que la acumulación de Na^+ en las hojas se incrementó significativamente.

Tabla IV. Relaciones iónicas en hoja, tallo y raíz de chile poblano y chiltepín.

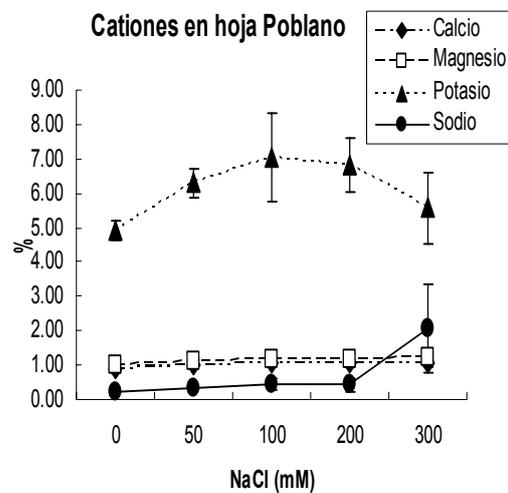
Variedad	Parte vegetal	NaCl (mM)	Ca/ Na	Mg/ Na	K/ Na
Poblano	Hoja	0	3.92±0.57 ^a	4.45±0.83 ^a	21.50±1.65 ^a
		50	2.91±0.58 ^a	3.34±0.69 ^a	18.41±2.25 ^a
		100	2.59±0.94 ^{ab}	2.82±0.80 ^{ab}	16.98±5.51 ^a
		200	2.77±0.77 ^{ab}	3.05±0.85 ^{ab}	18.05±6.19 ^a
		300	0.85±0.87 ^b	0.96±0.92 ^b	4.44±4.40 ^b
	Tallo	0	2.28±0.81 ^a	2.49±0.98 ^a	16.59±4.80 ^a
		50	0.95±0.11 ^b	1.06±0.06 ^a	7.38±1.41 ^b
		100	0.84±0.21 ^b	1.05±0.22 ^a	5.92±1.60 ^b
		200	0.28±0.04 ^b	0.37±0.01 ^a	2.10±0.48 ^b
		300	0.23±0.11 ^b	0.31±0.12 ^b	1.34±0.79 ^b
	Raíz	0	1.38±0.17 ^a	1.04±0.15 ^a	9.41±1.22 ^a
		50	0.89±0.04 ^b	0.74±0.04 ^b	5.74±0.40 ^b
		100	0.39±0.01 ^c	0.53±0.09 ^{bc}	2.54±0.16 ^c
		200	0.35±0.02 ^c	0.39±0.05 ^{cd}	2.83±0.25 ^c
		300	0.25±0.03 ^c	0.26±0.08 ^d	1.28±0.41 ^c
Chiltepín	Hoja	0	3.66±0.68 ^a	3.48±0.62 ^a	13.16±1.73 ^a
		50	2.03±0.98 ^{ab}	1.89±0.85 ^b	5.89±2.22 ^{bc}
		100	2.18±0.54 ^{ab}	1.99±0.47 ^{ab}	8.53±1.19 ^b
		200	0.65±0.59 ^b	0.60±0.51 ^b	2.48±1.78 ^c
		300	0.48±0.36 ^b	0.43±0.32 ^b	1.76±1.16 ^c
	Tallo	0	1.06±0.05 ^a	0.80±0.06 ^a	5.52±0.23 ^a
		50	0.39±0.17 ^b	0.24±0.11 ^b	1.32±0.81 ^b
		100	0.37±0.09 ^b	0.27±0.08 ^b	1.61±0.45 ^b
		200	0.20±0.07 ^b	0.17±0.06 ^b	0.63±0.36 ^b
		300	0.21±0.02 ^b	0.16±0.02 ^b	0.51±0.14 ^b
	Raíz	0	0.75±0.36 ^a	0.37±0.14 ^a	6.00±2.59 ^a
		50	0.77±0.09 ^a	0.34±0.05 ^a	7.24±1.99 ^a
		100	0.33±0.05 ^{ab}	0.18±0.02 ^{ab}	3.39±0.45 ^{ab}
		200	0.21±0.07 ^b	0.11±0.03 ^b	1.88±0.39 ^b
		300	0.19±0.08 ^b	0.09±0.02 ^b	1.44±0.29 ^b

Letras diferentes en cada columna indican diferencias significativas para $p < 0.05$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

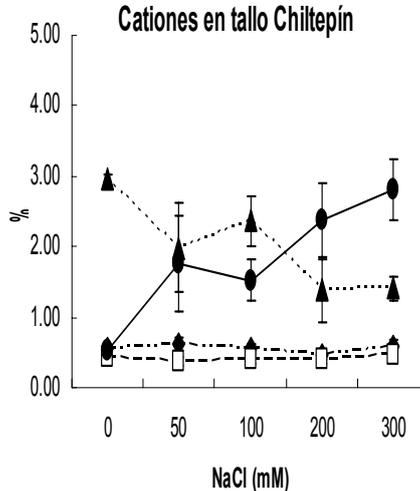
Cationes en hoja Chiltepín



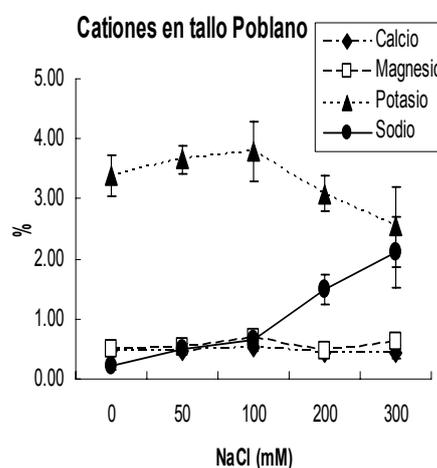
Cationes en hoja Poblano



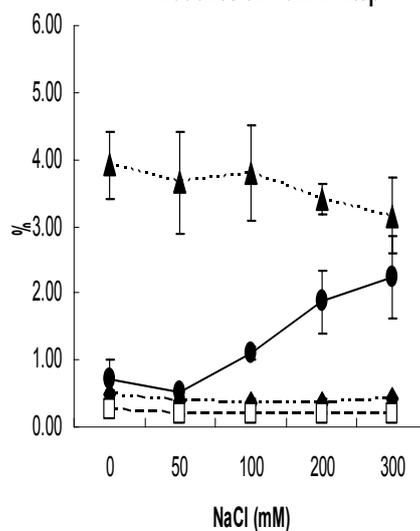
Cationes en tallo Chiltepín



Cationes en tallo Poblano



Cationes en Raiz Chiltepín



Cationes en Raiz Poblano

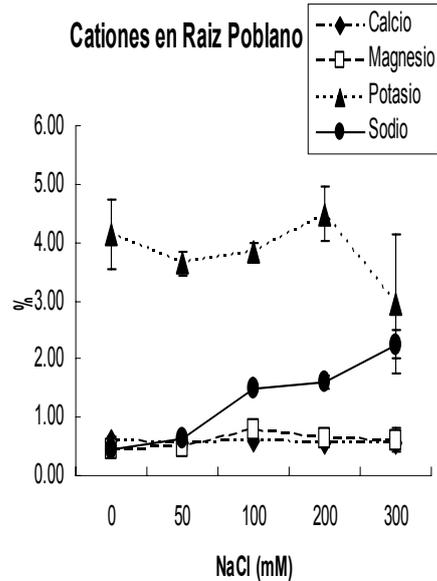


Figura 11. Contenido de cationes en hojas (arriba), tallo (en medio) y raíz (abajo) de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* y *Capsicum annuum* var. *annuum* bajo diferentes concentraciones de salinidad.

La reducción en el peso seco de la variedad de poblano en los tres órganos se correlacionó significativamente con las concentraciones de Na^+ que en ellos se registraron (Fig.12). En el caso de chiltepín vemos que solo en la concentración de 200mM para la raíz se da una disminución del peso seco, lo que coincide con la Tabla III que nos indica que el desarrollo de la planta de chiltepín no se vio afectada por las concentraciones de 50,100 y 300 mM.

6.1.9.2. Contenido de aniones Cloro, nitratos y sulfatos

Los resultados de los análisis de aniones en ambas variedades de Chile (Fig. 13) muestran un incremento en el porcentaje de cloro inducido por los tratamientos salinos, mostrando una relación ya que a mayor salinidad mayor presencia de este mineral en los tejidos. Se observa mayor cantidad de este ion en las hojas. Caso contrario de los nitratos los cuales se observa una tendencia a disminuir. Esta relación antagónica del Cl^- con respecto al NO_3^- se ve reflejada en la relación de biomasa acumulada.

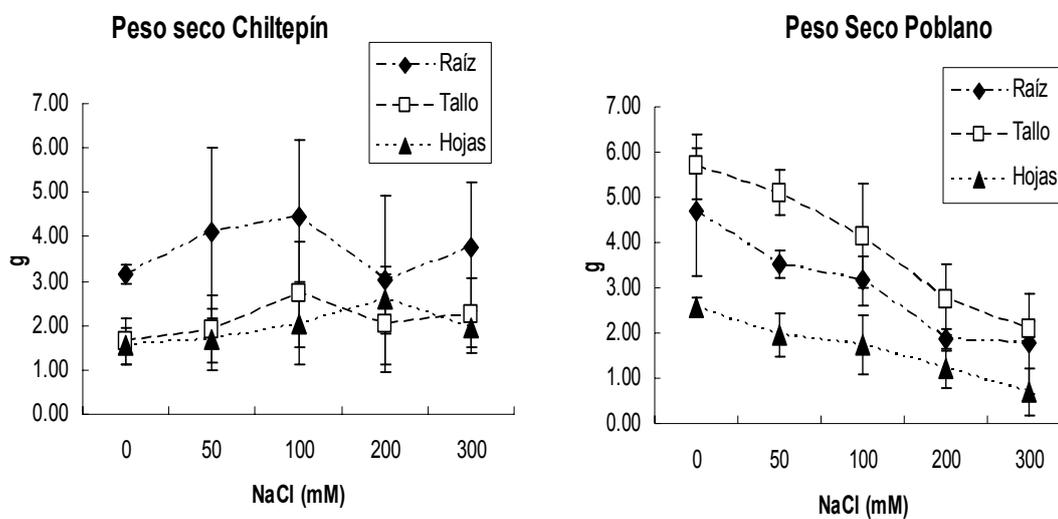
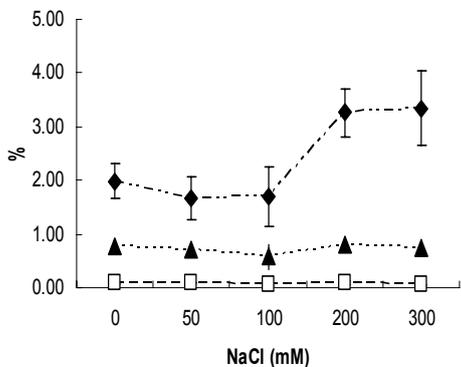
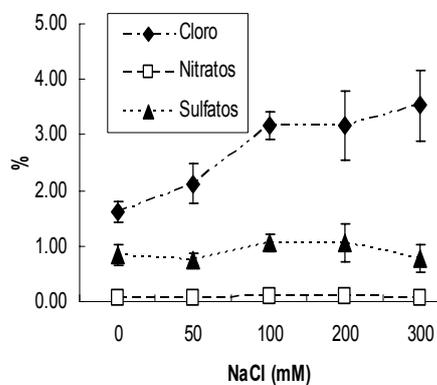


Figura 12. Relación entre contenido de Na^+ y peso seco en raíz, tallo y hojas de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (A) y *Capsicum annuum* var. *annuum* (B) bajo diferentes concentraciones de salinidad.

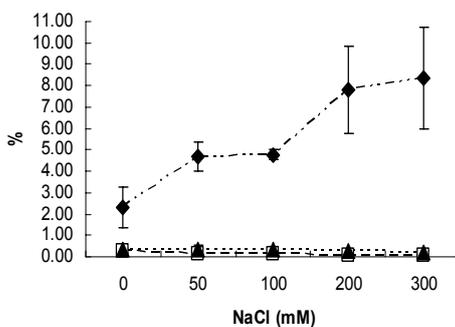
Aniones en raíz Chiltepín



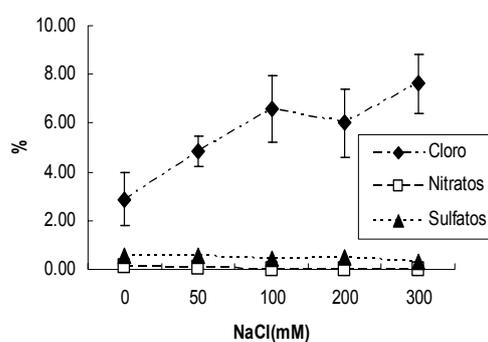
Aniones en Raíz Poblano



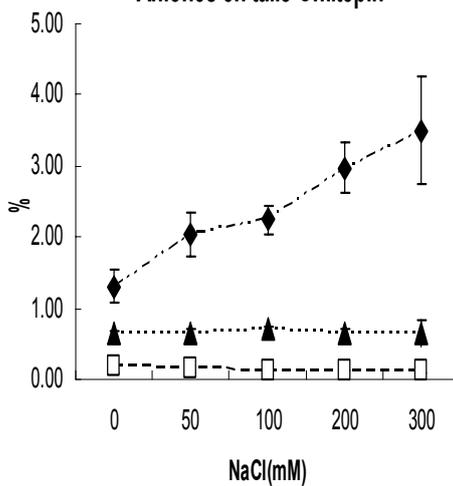
Aniones en hoja Chiltepín



Aniones en hojas Poblano



Aniones en tallo Chiltepín



Aniones en Tallo Poblano

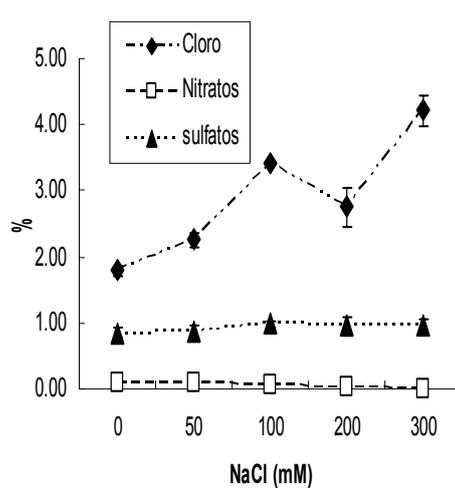


Figura 13. Contenido de aniones en hojas (arriba), tallo (en medio), y raíces (abajo) de de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* y *Capsicum annuum* var. *annuum* bajo diferentes concentraciones de salinidad.

En la figura 14 se muestra la evaluación entre cloro y nitratos donde observamos que cuando el porcentaje de concentración de cloro aumenta el porcentaje de los nitratos disminuyen en los órganos de tallo y hoja de ambas variedades y en la raíz de chiltepín existe una tendencia a mantener proporcional la concentración de nitratos aunque el porcentaje de cloro aumente, en la variedad de poblano la concentración de nitrato aumenta a mayor porcentaje de cloro.

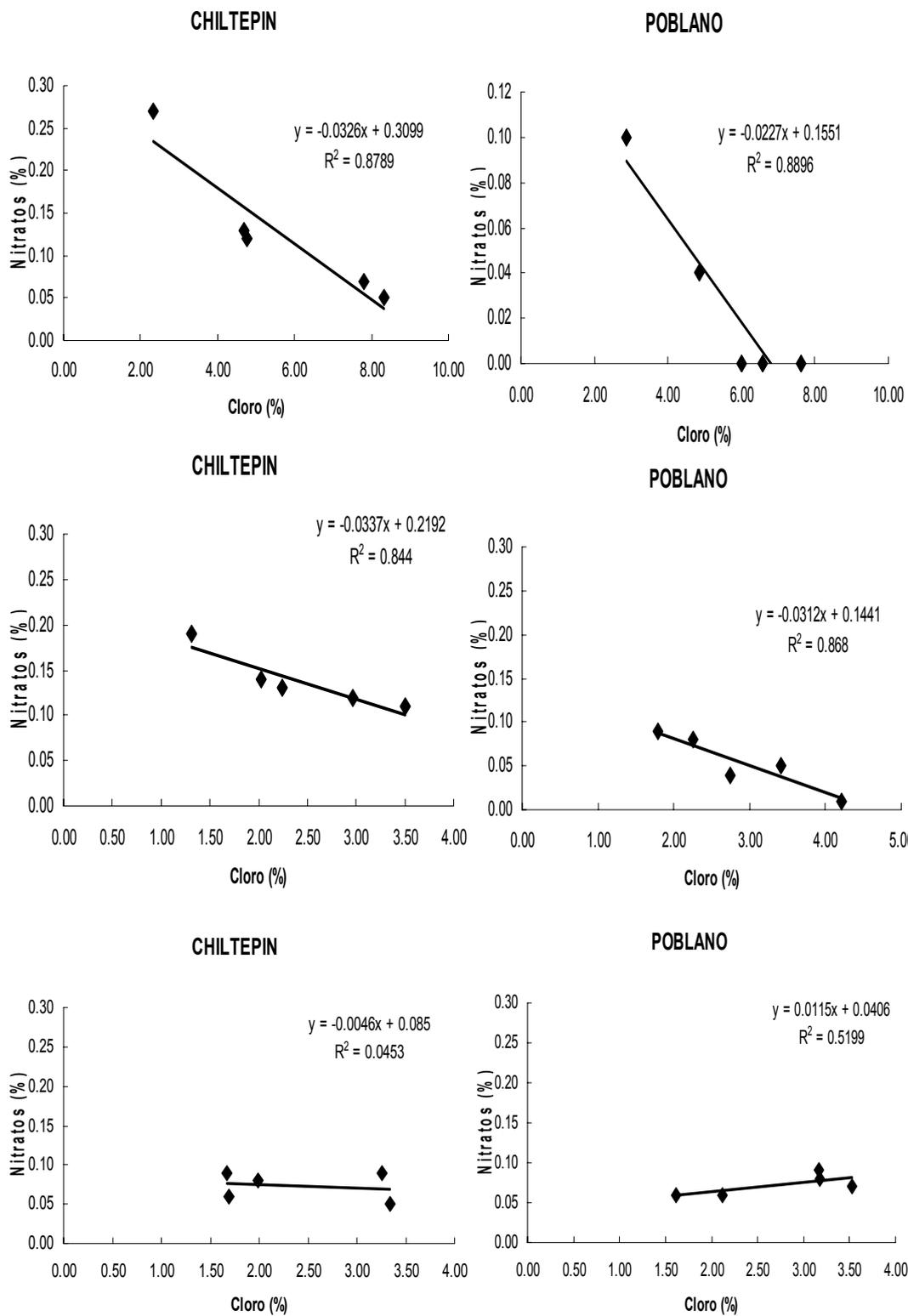


Figura 14. Relación entre contenido de NO_3^- y Cl^- en hojas (arriba), tallo (en medio) y raíces (abajo) de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* y *Capsicum annuum* var. *annuum* .

Los resultados de la evaluación de fósforo (Fig.15) para chiltepín muestran una tendencia a disminuir sus valores para tallo y raíz y en hoja una ligera tendencia a aumentar. En la variedad de poblano los cambios son inestables para hoja y raíz y para tallo muestran un valor constante.

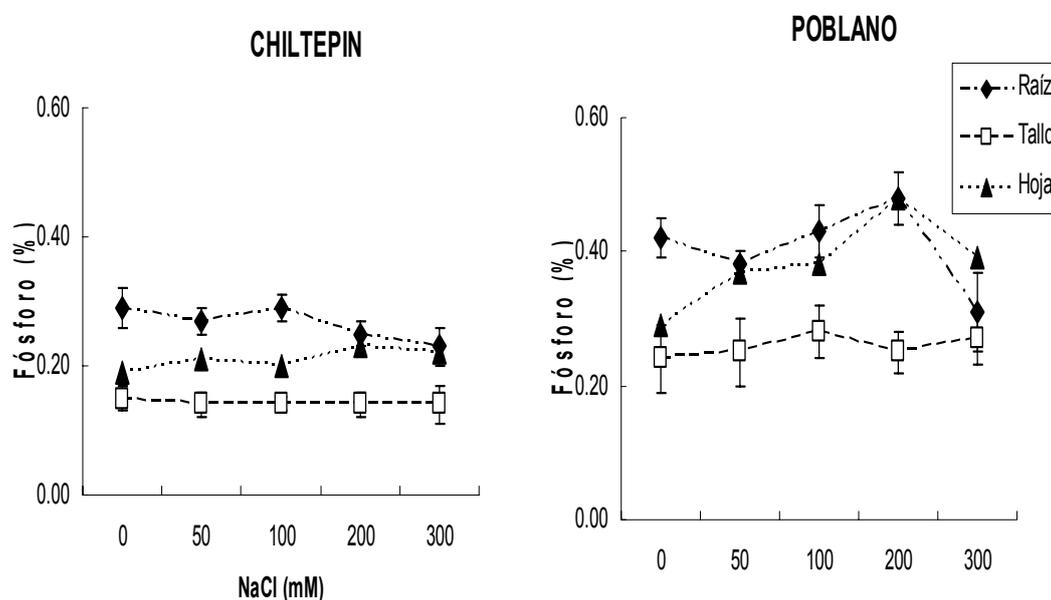


Figura 15. Contenido de fósforo en raíz, tallo y hojas de *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* y *Capsicum annuum* var. *annuum* .

6.2 Evaluación de la expresión de genes de chiltepín y chile poblano, en respuesta a estrés salino.

La evaluación de expresión de genes, se realizó mediante dos herramientas: Despliegue Diferencial (DD), para evaluar la expresión y supresión de genes en respuesta al estímulo salino y Macroarreglos moleculares, para la evaluación de los niveles de expresión de genes.

6.2.1. Expresión diferencial de genes de chiltepín bajo estrés salino, mediante Despliegue diferencial (DD)

6.2.1.1 Extracción de ARN

Los resultados de la primera extracción de ARN se realizó utilizando TRIzol, seguido de una eliminación de ADN genómico con ADNsa y precipitación con acetato de sodio 3M y etanol absoluto la imagen se muestra en la Fig. 16 panel A podemos ver que las bandas que indican la integridad del ARN no son claras en chiltepín. Sin embargo en maíz podemos ver la integridad de las respectivas bandas ribosomales 28S y 5S que pertenecen a la subunidad grande del ribosoma (60S) y las 18S que pertenece a la subunidad pequeña (40S) del ribosoma.

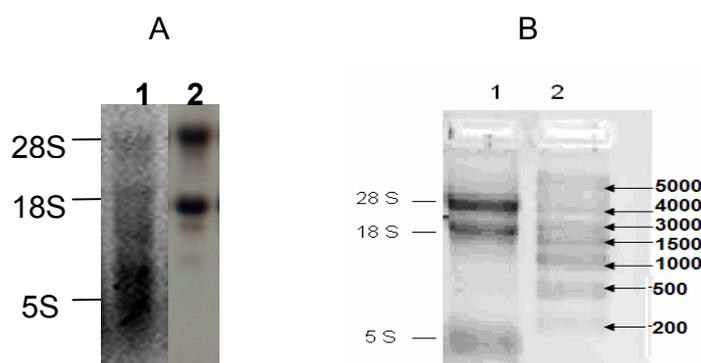


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa-formaldehído al 1 % de extracción de ARN total. Panel A) Extracción de ARN con TRIzol, carril 1: ARN de chile chiltepín, carril 2: ARN de maíz. Panel B) Extracción de ARN con TRIpure, carril 1: ARN de chile chiltepín, carril 2) Marcador de peso molecular de ARN (Invitrogen).

Las bandas 28, 18 y 5 S (en humanos) son de aproximadamente 4900, 1900 y 120 nucleótidos respectivamente, ésta información depende del organismo y de cada especie (Luque y Herráez, 2001). En el panel B de la Fig. 16 se muestran los resultados obtenidos donde se puede observar la integridad del ARN usando el agente catártico Tripure (carril 1), la concentración de material biológico es 323.5 ng/ μ l. Del segundo bioensayo (ver 5.1) se tomaron 2 hojas de la parte intermedia de la planta, se procedió a la extracción de ARN con TRIPURE y N_2 líquido y se precipitó con LiCl. Se corroboró la integridad del ARN en gel desnaturalizante de agarosa (Fig. 17) y se almacenó en alícuotas a $-80^\circ C$ para sus posteriores usos. Estos resultados nos permitieron seguir adelante con la técnica del DD.

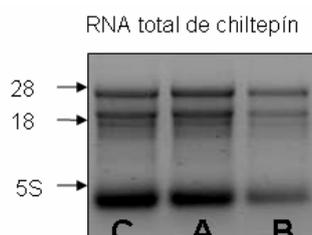


Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa-formaldehído al 1%. de ARN total de Chile chiltepín (C) control, (A) tratamiento A y (B) Tratamiento B.

6.2.1.2 Síntesis de ADN complementario (ADNc) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Los resultados de la imagen de la Fig. 18 confirman la calidad del ARN, se obtuvieron productos de 85 pb para los oligonucleótidos V18 y 500pb para los oligonucleótidos de ubiquitina.

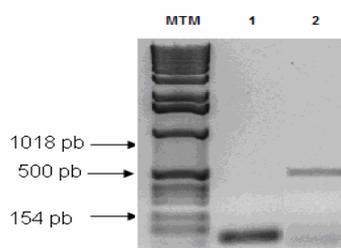


Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Evaluación de la calidad del ADNc obtenido con la enzima Sensiscript y oligo dT. Carril 1 amplificación con oligonucleótidos V18, carril 2 amplificación con oligonucleótidos de UBI y MTM marcador de peso molecular, 1 Kb plus (Invitrogen).

Con éstos resultados, se procedió a la síntesis de cDNA usando el oligonucleotido de anclaje APG y en la PCR se usaron los oligonucleotidos aleatorios descritos en la metodología.

6.2.1.3 Electroforesis y tinción de los productos amplificados

Con la técnica de Despliegue Diferencial (DD), obtuvimos evidencias de las diferencias con respecto al control y entre los tratamientos de salinidad, demostrando que existen diferencias a nivel de expresión.

En nuestro trabajo la técnica de DD nos dió como resultado un total de 595 bandas expresadas diferencialmente, el patrón de bandeo se observa en la Fig. 19. De todos estos seleccionamos los genes de que se sobre-expresaron o sub expresaron en ambos tratamientos con respecto al control (tabla V).

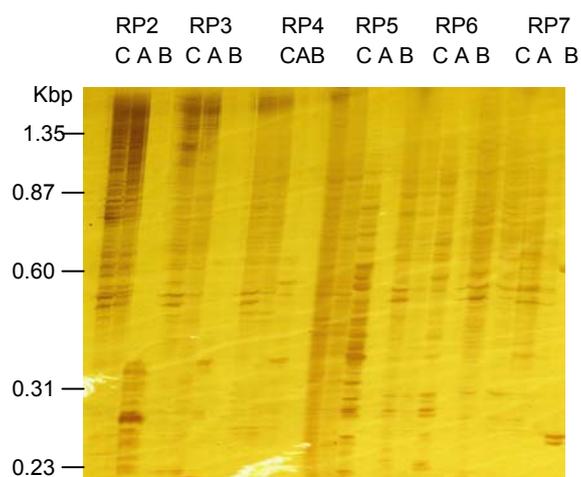


Figura 19. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (Urea 6%) teñidos con nitrato de plata. Patrón de bandeo del DD de chiltepín (C) control, (A) Genes de expresión temprana Tratamiento A, (B) Genes de expresión tardía.

Tabla V. Total de bandas expresadas diferencialmente en hojas de chiltepín bajo estrés salino.

órgano	Total de fragmentos presentes en el gel	Fragmentos amplificados diferencialmente						
		Sobre-expresados			Sub-expresados			Total
		C	A	B	C	A	B	
Hoja	560	12	10	38	15	8	120	203

De los 203 amplicones que se expresaron diferencialmente solo cortamos 60 bandas las más diferenciadas y de esas logramos clonar y purificar 10 bandas expresadas diferencialmente, las cuales se evaluaron por macroarreglos (Figura 21). Se etiquetaron poniendo el número consecutivo de banda cortada seguido de las iniciales de despliegue diferencial DD y enseguida el número del Random primer que se usó por ejemplo 14DDRP3, 23DDRP5, 2DDRP6, 20DDRP6, 24 DD RP5, 19 DD ,17 DDRP3 y 25 DDRP6.

6.2.2 Amplificación de genes usando oligonucleótidos específicos, obtenidos de un banco de genes sustractivo de Chile

6.2.2.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Se realizó un PCR de punto final, no cuantitativo, para conocer la presencia o ausencia de la expresión de genes en chiltepín control y bajo estrés salino. Se logró la amplificación de 16 genes utilizando ADNc de chiltepín y 12 genes utilizando ADNc de Chile poblano.

En la Tabla VI se muestran de manera resumida los cambios en la expresión de genes en respuesta al estrés salino. Cabe señalar que no se logró la amplificación de el factor de transcripción inducido por fosfatos-2, Lipoxigenasa y Alanina

aminotransferasa en ADNc de chiltepín y del ADNc de chile poblano la Acetolactato sintasa, el Inhibidor de la disociación GDP, Annexina, DEA 1, la Subunidad α de E1 de la piruvato deshidrogenasa y thaumatin. Se realizaron varias pruebas modificando la temperatura de alineación de los oligonucleotidos, concentración de $MgCl_2$ y número de ciclos, por lo que sugerimos que la ausencia de bandas se debe a que las secuencias de estos genes no son muy conservadas entre las 2 variedades.

Seis de los productos de PCR obtenidos a partir de ADNc de chiltepín se clonaron y secuenciaron para comparar las secuencias nucleotídicas de las 2 variedades (Fig. 20). El análisis bioinformático, mostró un máximo de 9 nucleótidos diferentes a lo largo de toda la secuencia, por lo que podemos decir que éstos genes tienen secuencias muy conservadas.

Tabla VI. Esquematización de la amplificación del PCR de punto final. Las cruces indican la presencia de la expresión de genes en ADNc de chiltepín y chile poblano bajo condiciones (C) control, (A) NaCl 300 mM, muestreo 30 min. y (B) NaCl 300 mM, muestreo 24 h.

		Chiltepín			Poblano		
Nombre	Gen	C	A	B	C	A	B
Oligonucleotidos							
Esterase	Esterasa del chile		X	X	X	X	X
StressRip	Proteína de stress-maduración	X					
Omedesat	Omega Desaturasa	X	X	X	X	X	X
CCoAOMT	Caffeoil-CoA metiltransferasa	X	X	X	X	X	X
Acetsynt325	Acetolactato sintasa	X	X				
GD1	Inhibidor de la disociación GDP	X	X				

TMV Ind Prot	Proteína inducida por TMV-1	X		X	X	X	
MADSbox	Factor de Transcripción de la caja MADs	X	X	X	X	X	X
Annexin	Annexina			X			
PHI2	Factor de transcripción inducido por fosfatos-2					X	
LPX	Lipoxigenasa					X	
Ala	Alanina aminotransferasa					X	
DEA	DEA1	X		X			
Samdc	S-adenosil metionina dextrboxilasa		X	X	X	X	
ER1PRINH	Subunidad α de E1 de la piruvato deshidrogenasa	X					
EPOXHYD	Epoxido Hidrolasa						X
Thaumatina	Thaumatina	X		X			
SesqCycla 316	No identificado	X		X		X	
Nir 3	Nitrato reductasa	X	X	X	X		

A)	Chiltepín	2	CAAGAGATTAATCGACTTAGTCAAGGTTGGTGGACTGATTGGCTAT-GACAACACCCTAT	60
	Guajillo	423	CAAGAGATTAATCGACTTAGTCAAGGTTGGTGGATTAAATTGGTTATNGACAACACCCTAT	482
	Chiltepín	61	GGAATGGATCAGTAGTGGCACCCCTGATGCAACCCTCAGAAAATACGTAAGGTATTATA	120
	Guajillo	483	GGAACGGATCAGTAGTGGCACCCCTGATGCAACCCTCAGAAAATACGTAAGGTATTATA	542
	Chiltepín	121	GAGATTTTGTATTGGAACCAACAAGGCCTTGGCTGCTGATCCAAGAATCGAAATTGGCC	180
	Guajillo	543	GAGACTTTGTATTGGAACCAACAAGGCCTTGGCTGCTGATCCAAGAATCGAAATTGGCC	602
	Chiltepín	181	AGCTTCAG	189
	Guajillo	603	AGCTTCAG	611
B)	Chiltepín	61	ACATCTGGTGGATTAGGAGCAATGGGATTTGGTTTGCCCGCTGCTATAGGTGCGCTGTT	120
	Guajillo	31	ACATCTGGTGGATTAGGAGCAATGGGATTTGGTTTGCCCGCTGCTATAGGTGCAAGCTGTT	90
	Chiltepín	121	GGAAGACCCGGGAGATTGTGGTTGACATTGATGGTGATGGGAGTTTATCATGAATGTG	180
	Guajillo	91	GGAAGACCCGGGAGATTGTGGTTGACATTGATGGTGATGGGAGTTTATCATGAATGTG	150
	Chiltepín	181	CAGGAGTTAGCAACAATTAAGGTGGAGAACCCTCCAGTTAAGATTATGTTGCTGAATAAT	240
	Guajillo	151	CAGGAGTTAGCAACAATTAAGGTGGAGAACCCTCCAGTTAAGATTATGTTGCTGAATAAT	210
	Chiltepín	241	CAACACTTGG	250
	Guajillo	211	CAACACTTGG	220
C)	Chiltepín	1	TGTGGACAAGCCATAATTGAGACAAAAGCTCGTGCCCTGAAGATTACTGAAGAGGTTCAA	60
	Guajillo	18	TGTGGACAAGCCATAATTGAGACAAAAGCTCGTGCCCTGAAGATTACTGAAGAGGTTCAA	77
	Chiltepín	61	AGGCAAGTATCTCTTACAAGGCCAGTAAGGATGCACTGGACAGGCTGCCGAATACATGT	120
	Guajillo	78	AGGCAAGTATCTCTTACAAGGCCAGTAAGGATGCACTGGACAGGCTGCCGAATACATGT	137
	Chiltepín	121	GGACAGGTTCAAGTTGCAGACATTGGATTTCATGGGATGCATGACTAGGGACAAGGACAAG	180
	Guajillo	138	GGACAGGTTCAAGTTGCAGACATTGGATTTCATGGGATGCATGACTAGGGACAAGGACAAG	197
	Chiltepín	181	AAGACTGTAGAAGGTGCCGATGTTTTCTTAGGCGGCAGAATAGGAGTGATTACATTTA	240
	Guajillo	198	AAGACTGTAGAAGGTGCCGATGTTTTCTTAGGCGGCAGAATAGGAGTGATTACATTTA	257
Chiltepín	241	GGAGAAGTATATAAGAAGGCAG	262	
Guajillo	258	GGAGAAGTATATAAGAAGGCAG	279	

D)

Chiltepín	1	TAAGGAGATGGTGAGAGGGAAAACACAGATGAGGCGTATAGAGAACGCCACGAGCAGGCA	60
Guajillo	101	TAAGGAGATGGTGAGAGGGAAAACACAGATGAGGCGTATAGAGAACGCCACGAGCAGGCA	160
Chiltepín	61	AGTCACTTTCTCTAAGCGTAGAAATGGGCTGCTCAAAAAAGCTTTTGAGCTTTCAGTTCT	120
Guajillo	161	AGTCACTTTCTCTAAGCGTAGAAATGGGCTGCTCAAAAAAGCTTTTGAGCTTTCAGTTCT	220
Chiltepín	121	GTGTGATGCTGAAGTCGGATTGATTATTTTTTCTCCAAGAGGAAAGCTCAATGAATTTGC	180
Guajillo	221	GTGTGATGCTGAAGTCGGATTGATTATTTTTTCTCCAAGAGGAAAGCTCAATGAATTTGC	280
Chiltepín	181	CAGCTC	186
Guajillo	281	CAGCTC	286

E)

Chiltepín	127	CACTCGTGGTAGTTTCATCTTTCTGGGGCTCAACCATACCACATCGTCACTTCT	182
Guajillo	651	CACTCGTGGTAGTTTCATCTTTCTGGGGCTCAACCATACCACATCGTCACTTCT	596

F)

Chiltepín	1	CACAGCTTATGTCCGAAC TGGGCCATTGACGAGGATGCAACTGACTCAAAAATCACCTT	60
Chile C. annum	27	CACAGCTTATGTCCGAAC TGGGCCATTGACGAGGATGCAACTGACTCAAAAATCACCTT	86
Chiltepín	61	AACTCTGTATGATGCGAGTGGTCATGGAATTAGAATCAACAACCTAGTGA-CTTGGGGTG	119
Chile C. annum	87	AACTCTGTATGATGCGAATGGTCATGGAATTAGAATCAACAACCTAGT-AGCTTGGGGTG	145
Chiltepín	120	GGCTTATGGGCAAAGGTTACAAC TACTTTGAAAGGGAAAAC TGGATATGTTCA GTGGGA	179
Chile C. annum	146	GGCTTATGGGCAAAGGTTACAAC TACTTTGAAAGGGAAAAC TGGATATGTTCA GTGGGA	205
Chiltepín	180	AGGGCCCCTGTTTGAATGGGACCATATGCAAAATGGTCTTGGCTTCTGATGGTACAGGCC	239
Chile C. annum	206	AGGGCCCCTGTTTGAATGGGACCATATGCAAAATGGTCTTGGCTTCTGATGGTACAGGCC	265
Chiltepín	240	GAAACCATGAATGGTTCTGTAAC TACGTGGAAGTCACTTCTACAGGAGCCCAAAACGAT	299
Chile C. annum	266	GAAACCATGAATGGTTCTGTAAC TACGTGGAAGTCACTTCTACAGGAGCCCAAAACGAT	325
Chiltepín	300	GCAGCCAACAAC TGTCCCGTGGATCAGTGGCTTAGCACC AATCGTTCACCGT	353
Chile C. annum	326	GCAGTCAACAAC TGTCCCGTGGATCAGTGGCTTAGCACC AATCGTTCACCGT	379

Figura 20. Análisis de BLAST2 de las secuencias nucleotídicas de chiltepín con chile guajillo. (paneles A, B, C, D, E) y chile *C. annum* (Número de acceso en GenBank: [AF480414](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuclot/AF480414), panel F). En negrita se indican las diferencias nucleotídicas.

6.2.2.2 Anotación de genes en base de datos

Las secuencias de los fragmentos parciales de los 6 genes se depositaron en el GenBank, disponibles bajo los números de acceso mostrados en la Tabla VII.

Tabla VII. Número de acceso en la base de datos del GenBank para los genes de chiltepín.

Nombre del gen	Número de acceso en GenBank
Caffeoil-CoA O metiltransferasa	<u>GO239216</u>
Proteína inducida por TMV-1	<u>GO239217</u>
Factor de Transcripción de la caja MADs	<u>GO239220</u>
S-adenosil metionina dexcarboxilasa	<u>GO239221</u>
6.-Acetolactato sintasa	<u>GO239218</u>
Nitrato reductasa	<u>GO23219</u>

6.3 Evaluación de la expresión diferencial de genes de *C. annuum* var. *glabriusculum* (*chiltepín*) y *C. annuum* var. *annuum* (*poblano*) mediante la técnica de Macroarreglos

Los productos obtenidos diferencialmente de la técnica de DD y de la Amplificación con oligonucleotidos específicos se inmovilizaron y se hibridaron con una sonda de ARN de chile poblano marcada con digoxigenina. La hibridación es una técnica que se basa en la complementariedad de cadenas de ADN o ARN (Lewin, 1997). Los análisis de los resultados se dividieron en tres partes: controles, hibridados entre ambas variedades y sin hibridación.

Los controles, llevados a cabo con la hibridación de genes de chile poblano con sonda de chile poblano hibridaron positivamente lo cual nos indica que la hibridación fue correcta (Tabla VIII). En los resultados de la evaluación de la expresión de genes observamos que los siete genes se encuentran en el control, pero que la expresión de algunos de ellos desaparece y en otros como caffeoil-CoA O metiltransferasa, proteína inducida por TMV y factor de transcripción de la caja MADs disminuyen su expresión, ésto se observó en el tratamiento B, en donde no se detectó intensidad de pixeles suficientes para cuantificar.

Tabla VIII. Evaluación de la expresión de genes por macroarreglos. Genes de chile poblano inmovilizados y sonda marcada de ADNc chile poblano de control, tratamiento A y tratamiento B.

Nombre del gen evaluado	Intensidad media (pixeles)	
	Control	Tratamiento A
Esterasa del chile	49	
Omega Desaturasa	76	
Caffeoil-CoA O metiltransferasa	49	41
Proteína inducida por TMV	46	45.5
Factor de Transcripción de la caja MADs	57	51
S-adenosil metionina descarboxilasa	57	
Nitrato reductasa	45	

Genes hibridados entre ambas variedades (genes de chile chiltepín con sonda de chile poblano). Se evaluaron un total de 11 genes, 5 obtenidos por PCD utilizando oligonucleotidos específicos para dichos genes y seis con la técnica de DD.

Los genes: Omega desaturasa, Proteína inducida por TMV-1, S-adenosil metionina dextracarboxilasa, Factor de Transcripción de la caja MADs, Nitrato reductasa, 2, 9, 14, 20, 25 de DDRP6 y 19 DDRP4, Se encuentran en ambas variedades de chile. Se puede observar que la proteína inducida por TMV aumenta significativamente la expresión por estrés salino, mientras que el factor de transcripción de la caja MADs disminuye su expresión. (Tabla IX)

Tabla IX. Evaluación de la expresión de genes por macroarreglos, con genes de chile chiltepín inmovilizados y sonda marcada de ADNc chile poblano de control, tratamiento A y tratamiento B.

Nombre del gen evaluado	Intensidad media (píxeles)	
	Control	Tratamiento A
Omega desaturasa	33,5	
Proteína inducida por TMV-1	44	37*
S-adenosil metionina dextracarboxilasa	55	
Factor de Transcripción de la caja MADs	53	62
Nitrato reductasa	45	

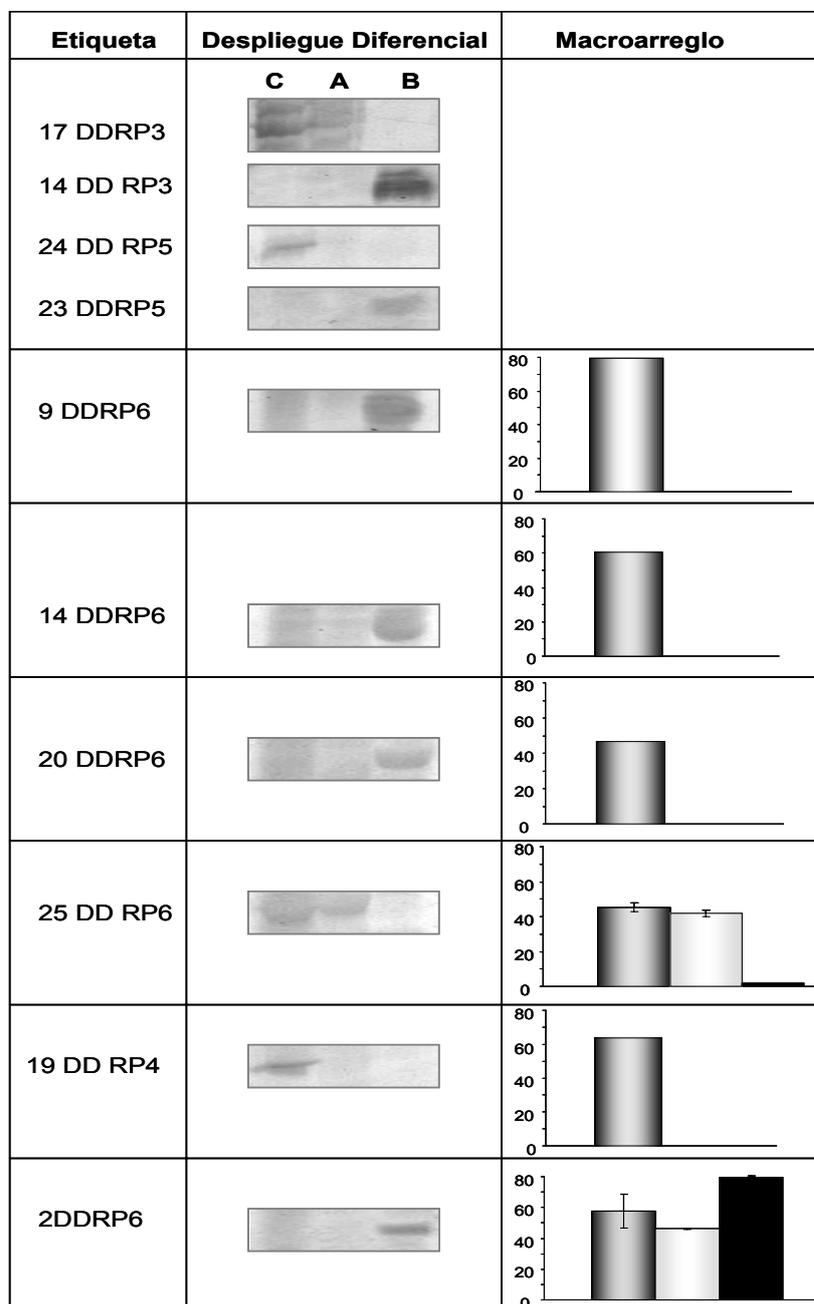


Figura 21. Expresión de genes tempranos y tardíos por efecto del estrés salino. La columna de etiqueta, corresponde al nombre que se le dio a la banda en el despliegue diferencial (DD). La columna de DD, muestra las bandas expresadas diferencialmente en chiltepín bajo las siguientes condiciones: C: Control, A:

Tratamiento 300 mM NaCl, muestreo a los 30 min., B: Tratamiento 300 mM NaCl, muestreo a 24 h. La columna, macroarreglo, presenta los gráficos de la intensidad media (píxeles, eje Y) de cada uno de los genes de chiltepín obtenidos por despliegue diferencial e hibridados con sondas de chile poblano. La barra de control se muestra en color negro con gris, el tratamiento A, en color blanco y el tratamiento B en color negro.

Los genes sin hibridación fueron los que codifican para las proteínas: Esterasa del chile, Acetolactato sintasa, Inhibidor de la disociación GDP, DEA-1 inducida por ácido, Subunidad α de E1 de la piruvato deshidrogenada y una con función desconocida. Éstas no fueron complementarias entre las la variedad de chile chiltepín y la de chile poblano, por lo que podemos sugerir que la variedad cultivada (poblano) pudo haber perdido o reprimido la expresión de estos genes por el proceso de domesticación o que son genes con baja identidad entre las dos variedades por lo que no se logró la hibridación. En cambio la variedad silvestre o antecesora de la cultivada los mantiene o los expresa como una respuesta al estrés.

VII DISCUSIÓN

El chiltepín presentó un porcentaje de germinación bajo (10%), en especies silvestres esto es considerado normal, puesto que esto es una medida ecológica de la semilla para preservar la especie (Besnier, 1989). García en el 2004 señaló que las semillas de chiltepín poseen bajas concentraciones de giberelina, además de que la semilla posee una testa dura y la presencia de cera epicuticular, lo que origina una germinación escasa y por lo tanto reducción de viabilidad.

Hernández en el 2002 realizó estudios con diferentes poblaciones de chile silvestres donde evaluó efectos de luz, temperatura y ácido giberélico y reportó porcentajes de germinación que van de 10.14% hasta el 57.30 % dependiendo de los parámetros empleados para la germinación.

En el caso del porcentaje de germinación de chile poblano el porcentaje de germinación reportado es de aproximadamente del 100%, característico de especies domesticadas (Hernández; 2002).

El chile poblano es una planta del tipo de las glicofitas, las referencias indican esta variedad solo tolera 25mM de NaCl. Un estudio realizado por Larrinaga en el 2001 en diferentes cultivares de chile poblano a la salinidad de 50 mM las plantas se ven afectadas drásticamente siendo su evaluación hasta 100 mM. Las evaluaciones realizadas en el presente estudio, se realizaron a 300 mM de NaCl con la finalidad de observar un efecto en la expresión temprana y tardía de genes, además de evaluar la resistencia de la variedad chiltepín.

Los datos de transpiración mostraron una tendencia a disminuir en la variedad de chiltepín pero de una manera constante y uniforme, sin embargo en la variedad de poblano vemos que existe un aumento en la concentración de 200mM lo que nos indica un esfuerzo que hace la planta para tratar de sobrevivir. La tasa de transpiración está ampliamente relacionada con la entrada de CO₂ por los poros de los estomas y la salida de agua por difusión, en forma de vapor. Éste punto es básico para la nutrición de la planta ya que de aquí se obtienen moléculas de

carbono que se emplearan en el proceso fotosintético, otros procesos colaterales de la transpiración es el flujo de agua desde el suelo hasta la hoja y el enfriamiento mismo de la hoja.

Entonces cuando el grado de apertura de los estomas se ve afectado por el potencial hídrico, la transpiración disminuye. El control de la transpiración se realiza mediante modificaciones morfofisiológicas, que incluyen la reducción del tamaño de la hoja, un incremento en la presencia de pelos epidérmicos y estomas hundidos (menor apertura) y la consecuente reducción de la ruta de difusión del vapor de agua. Los mecanismos que reducen la transpiración bajo condiciones de estrés hídrico incluyen la caída, el enrollamiento y el plegamiento de la hoja. (Salisbury, 1994)

El chile chiltepin desde la primer concentración de NaCl, disminuyó su transpiración lo que nos indica que este organismo puede tener un mecanismo en el cual pueda mantener los estomas cerrados sin verse afectado su desarrollo y crecimiento. Caso contrario del chile poblano hasta concentración de 100 mM mantuvo sus estomas cerrados para tolerar el estrés salino sin embargo al aumentar la concentración de sal tuvo que abrir los estomas para mayor captura de CO₂ y así tratar de mantener el desarrollo este esfuerzo se ve reflejado en el daño que sufren las hojas de las plantas y la disminución de tamaño.

Los resultados de clorofila, obtenidos para la variedad de poblano concuerdan con lo reportados por Larrinaga en el 2001, donde evaluó estrés salino hasta 100mM. En dicho trabajo y en éste rango de salinidad, las clorofilas muestran una disminución, sin embargo no hay evaluaciones a concentraciones mayores de salinidad. En nuestro trabajo, la evaluación de 200 y 300 mM (Fig.5) las clorofilas comienzan a elevar sus valores conforme aumenta la concentración de NaCl. También observamos en la Fig. 3 como la planta a concentración de 300 mM tienen un color verde oscuro mas intenso que en las concentraciones de 200, 100, 50 y 0 mM. Sin embargo si observamos la concentración de Mg en la Fig. 11 disminuye lo que nos indica que no hubo una síntesis de clorofila sino que entonces este aumento se debe a otros motivos. Las clorofilas son pigmentos

que absorben la luz, La clorofila A esta presente en todas las plantas fotosintéticas, la clorofila B, en la mayoría de las plantas verdes. La clorofila es un tetrapirrol y contiene un átomo de magnesio.

Estos pigmentos se encuentran en los cloroplastos, cuando los rayos de la luz visible inciden sobre las hojas son atrapados por la clorofila A y B los cuales absorben luz roja (600-700nm) y azul (400 y 500nm). Cuando un fotón de luz choca con los cloroplastos, interaccionan con un electrón de los pigmentos; el electrón acepta la energía lumínica y se excita; esto es se incrementa su nivel de estado energético. Una vez que los electrones han sido excitados por los fotones de luz, estos regresan a su estado original de diferentes maneras, dependiendo de la naturaleza del medio ambiente; generalmente por emisión de calor, reaccionando químicamente con otras moléculas, intervienen en reacciones fotoquímicas durante la fotosíntesis o remitiendo la energía como fluorescencia. Esto ultimo sucede si las reacciones de la fotosíntesis se bloquean por sustancias toxicas. La fluorescencia ocurre *in vivo*, porque la energía absorbida no puede utilizarse. Las soluciones de clorofila fluorescen con un color rojo oscuro. Estos fundamentos nos llevan a pensar que en nuestra investigación ocurrió un daño en las clorofilas causado por el ión Na^+ ya que los análisis de minerales donde se evaluó el Mg^2 este disminuyo lo que quiere decir que no hubo un aumento de la molécula de clorofila sino de una emisión de fluorescencia por haberse dañado la moléculas de clorofila o por bloqueo de enzimas que participan en el proceso fotosintético.

En cuanto al área foliar y número de hojas, encontramos que chiltepín no hubo diferencias significativa en las evaluaciones y en poblano si las hubo pero con una tendencia a disminuir ambos parámetros evaluados. Un mayor número de hojas en el dosel y una mayor superficie de área foliar es benéfico para la planta ya que tiene más maquinaria fotosintética que le permitirá mantener y desarrollar sus funciones metabólicas mientras pasa o se adapta al estrés. En la variedad de chiltepín el que no exista diferencias significativas entre los grupos y el control nos indica que no existe cambio morfológico o físico en la planta eso es muy

interesante ya que podemos decir que la planta está tolerando el estrés salino. El caso contrario se observa en la variedad de poblano en el que el efecto del estrés es visible por la diferencia significativa de los datos estadísticos y sus condiciones morfológicas.

Las hojas son los principales protagonistas de numerosas funciones vitales para el crecimiento y desarrollo, tales como la interceptación y absorción de la radiación solar incidente, la fotosíntesis, la transpiración y la translocación de fotoasimilados. La hoja es también la superficie de intercambio entre la planta y el medio aéreo, así como el lugar donde se realiza la fotosíntesis. Es así como la intensidad de estos intercambios y de la actividad fotosintética dependen del área foliar (Welles y Norman, 1991). El área foliar es un indicador de la radiación interceptada de la que depende el potencial fotosintético (Ollat et al., 1998). Un estrés salino conlleva un estrés hídrico ya que se reduce la cantidad disponible para la planta y sus necesidades de agua no son correspondidas. Esto implica una reducción del área foliar (Lira, 2003) y el cierre de los estomas para evitar la evapotranspiración. La raíz, al detectar una reducción en la absorción de agua, a través de la síntesis de ácido abscísico (ABA), es capaz de producir cambios fisiológicos como el cierre de los estomas (Pimienta, 2006). Como consecuencia de esta disminución de la evapotranspiración, se reduce el crecimiento de la planta y la asimilación neta. Lo anterior se corroboró mediante evaluaciones de peso fresco y seco de hoja, en donde encontramos que estas evaluaciones no presentan diferencias significativas en chiltepín y en poblano hubo una diferencia significativa en la disminución de ambos parámetros evaluados. El peso seco indica de forma certera la cantidad de materia que generó la planta durante el desarrollo y el peso fresco nos da una idea general de la cantidad de agua con respecto al peso seco que contiene la planta.

Esto nos sugiere la habilidad de la planta de chiltepín por conservar agua aun en condiciones de estrés osmótico e iónico.

La mayor parte del agua pasa a través de la planta y se expulsa en forma de transpiración, pero solo el 1% es retenida en los tejidos (Hanks, 1983). Sin

embargo esta pequeña fracción es de suma importancia, una pequeña cantidad de agua retenida puede ser la causa de un crecimiento vigoroso o un mínimo desarrollo, también puedes ser la diferencia entre una planta saludable y una débil. La retención de agua en el tejido depende del balance hídrico entre la absorción de agua por la planta y la pérdida por transpiración.

La razón por la que un tejido puede tener mayor contenido de agua es porque la absorción es mayor que la transpiración. Caso contrario sucede si la absorción de agua es limitada por exceso de iones y por ende un déficit hídrico causado por un daño osmótico. En tal caso la transpiración aumenta y el contenido de agua en el tejido disminuye (Lira, 2003), éste efecto lo presentan las hojas de chile poblano.

Los resultado de peso seco muestran la tendencia a disminuir en la variedad de poblano conforme aumenta la concentración de sal, lo que nos indica la insuficiente captación de CO₂ y luz por los estomas. Los carbohidratos son base de la estructura para el desarrollo y crecimiento de la planta, estas ineficiencias de la planta son consecuencia de una pobre absorción de agua debido al exceso de iones en el medio, provocando una disminución en el potencial hídrico y el cierre de estomas.

Las evaluaciones de peso fresco y seco de la raíz mostraron que la raíz de la variedad chiltepín aumenta de tamaño y peso, lo cuál nos indica que sus células conductoras como los pelos radicales se extienden e incrementan el contacto suelo-raíz así como el volumen del suelo que se penetra. Además de la absorción de agua, esto nos permite concluir que cumple la función básica de absorber el agua y los nutrientes para así poder traslocarlos a las hojas y tallos, por medio de capilaridad y presión radical, para que estas lleven acabo el proceso fotosintético obteniendo así sacarosa que será transformada en ATP (Lira, 2003). Para una planta en crecimiento o desarrollo es muy importante la interdependencia de las actividades entre la raíz y la parte aérea. La morfología de los sistemas radicales es controlada principalmente por mecanismos genéticos más que ambientales sin que este deje de influir (Klepper, 1987). Otro órgano importante es el tallo, que juega el papel de sistema vascular en las plantas, por él circulan

los nutrientes y el agua, además de darle un soporte vertical sobre los suelos. El movimiento de agua por difusión de célula a célula permite un rápido abastecimiento a los extremos superiores de la planta, manteniendo así un equilibrio entre las tasas de absorción y transpiración. Así cuando la transpiración aumenta, la demanda de un suministro mayor de agua hacia las hojas se transmite a las raíces mediante un descenso del potencial hídrico de la savia del xilema, lo cual causa un aumento en la absorción. A la inversa cuando la absorción de agua se reduce, la información llega rápidamente por este sistema a la hoja en forma de un descenso del potencial hídrico de la savia del xilema, que causa una pérdida en la turgencia en las células guarda y consecuentemente los estomas se cierran.

El análisis de minerales se realizó para entender los mecanismos fisiológicos responsables de la tolerancia a la salinidad de estas especies. Es necesario conocer si su crecimiento está siendo limitado por el efecto osmótico del NaCl en el medio de cultivo, o por el efecto tóxico de la sal en el interior de la planta. En un análisis sencillo de la respuesta de una planta al estrés salino, la reducción del crecimiento del follaje ocurre en dos fases: una rápida respuesta al incremento de la presión osmótica externa, y una respuesta lenta debido a la acumulación de Na^+ en las hojas (Munns y Tester, 2008). La exclusión de Na^+ de las hojas se refiere al mecanismo que poseen ciertas plantas para limitar la absorción de este ión por las raíces y la restricción en su transporte hacia las hojas al retenerlo en la raíz o tallo de la planta para asegurar que no se acumule a concentraciones tóxicas (Greenway y Munn, 1980). De acuerdo a los resultados de este estudio, en chile poblano opera este mecanismo ya que el Na^+ se acumuló preferentemente en el tallo y raíz (Fig.11) para prevenir que se acumulara a concentraciones tóxicas en las hojas. El chiltepín mostró capacidad para tolerar salinidad sin importar la acumulación de Na^+ en los tejidos de las hojas. Este es un mecanismo empleado por algunas plantas, principalmente halófitas (Flowers et al., 1977), las cuales almacenan el Na^+ a nivel celular en vacuolas y/o intracelular para evitar concentraciones tóxicas dentro del citoplasma, especialmente en células del

mesófilo de las hojas (Zhu, 2002). Los daños por toxicidad ocurren con el transcurso del tiempo, después de que el Na^+ en las hojas alcanza elevadas concentraciones en las hojas viejas, las cuales ya no tienen capacidad para expandirse y diluir la sal que les está llegando y consecuentemente empiezan a morir. El tallo y pecíolos de algunas especies tienen la capacidad de retener Na^+ para prevenir la acumulación de Na^+ en la paleta de la hoja (López et al., 1999). En este estudio, el contenido de Na^+ se incrementó significativamente con la salinidad en las dos especies, pero en poblano esto fue más evidente a partir de 100 mM de NaCl, mientras que en chiltepín esto ocurrió desde los 50 mM de NaCl (Fig.11).

En poblano la estrategia de retener Na^+ en el tallo colaboró para evitar la acumulación de Na^+ en las hojas operó hasta 200 mM de NaCl, mientras que en chiltepín este mecanismo funcionó hasta 100 mM de NaCl y posteriormente el Na^+ penetró fácilmente a las hojas. Más que en las raíces, el principal sitio que presenta toxicidad por Na^+ en la mayoría de las plantas es la paleta de la hoja en donde se acumula después de que alcanza el xilema y se mueve junto con la corriente de transpiración (López et al., 1999). Es importante resaltar que en chile poblano, una especie considerada como sensible a la salinidad, no existió acumulación excesiva de Na^+ en las hojas hasta 200 mM de NaCl, pero la producción de materia seca se afectó significativamente a partir de 50 mM de NaCl. Esto sugiere que la reducción en el crecimiento fue causada principalmente por el incremento del potencial osmótico en el medio de cultivo por el NaCl aplicado o es una variedad muy sensible a la toxicidad por Na^+ .

El contenido de Na^+ en la raíz se incrementó significativamente a partir de 100 mM de NaCl en las dos especies (Fig.11). A moderadas concentraciones de salinidad, el Na^+ puede entrar a las raíces de manera pasiva a través de los canales catiónicos no selectivos, pero cuando la salinidad es muy elevada la selectividad de la membrana plasmática se pierde y el Na^+ se mueve fácilmente con el agua atravesando la corteza de la raíz hacia la stele. Durante esta trayectoria, el Na^+ es

removido de este flujo y secuestrado en las vacuolas de las células (Jeschke., 1984).

Las dos variedades mostraron capacidad para retener Na^+ en las raíces como mecanismo para evitar la liberación de estos iones a la corriente transpiratoria del xilema. Comúnmente es reportado que el Na^+ retenido en las raíces puede ser secuestrado en las vacuolas utilizando antiportadores Na^+/H^+ del tonoplasto como los que pertenecen a la familia del intercambiador (NHX) en Arabidopsis (Pardo et al., 2006). Si se produce una entrada importante de Na^+ en el citosol, la relación K^+/Na^+ fisiológica debe ser restablecida para evitar el efecto tóxico del Na^+ . El antiportador Na^+/H^+ acopla la entrada de Na^+ a la salida de H^+ . La presencia de una actividad antiportadora Na^+/H^+ se detectó oligonucleotidoso en tonoplasto de especies tolerantes a salinidad como remolacha y cebada, donde se inducía por la presencia de NaCl en el medio (Barkla y Pantoja, 1996). La expresión del gen HAL1 en Arabidopsis y tomate (Rus et al., 2001), aumenta la tolerancia al estrés salino en estas plantas por una mejora de la selectividad K^+/Na^+ . Esto sugiere que en plantas como chile, una secuestación más eficiente de Na^+ podría mejorar la tolerancia tisular a la toxicidad por Na^+ , quizás mediante la reducción de las concentraciones de este ión en el citosol. Aunque se requieren estudios adicionales para esclarecer si el daño en estas especies es por toxicidad de Na^+ o por efecto osmótico, los resultados de este experimento indican que, tanto la especie sensible (poblano) como la considerada resistente (chiltepín) mostraron capacidad para retener Na^+ en las raíces, sin embargo es probable que a pesar de que el chile poblano usa este mecanismo para conseguir que solo entren concentraciones bajas de Na^+ a la corriente transpiratoria del xilema, estas son suficientes para dañar severamente a las hojas. El tallo del chile poblano también acumuló Na^+ e impidió que llegara a las hojas, pero es difícil establecer si tiene o no el mecanismo para retener Na^+ ya que el experimento utilizó plantas completas y existe la posibilidad de que la misma retención efectuada en la raíz provocó un transporte lento de Na^+ o existió una recirculación de este ión entre tallo y raíz

(Jeschke, 1984). Para conocer esto es indispensable llevar a cabo experimentos de estrés salino, pero utilizando órganos vegetales separados.

No obstante de que en este experimento la concentración de Na^+ en las hojas del chile poblano se consideran bajas existen estudios que reportan que se observan fácilmente síntomas de toxicidad por Na^+ cuando las hojas de plantas sensibles contienen aproximadamente 0.25% de Na^+ (Bresler et al., 1982). Presumiblemente el retraso en el crecimiento de esta especie fue ocasionado por efecto osmótico, sin embargo la reducción en el peso seco de los tres órganos correlacionó significativamente con las concentraciones de Na^+ que en ellos se registraron (Fig.12).

El chile poblano, han evolucionado bajo condiciones de baja salinidad en el suelo. Consecuentemente, han desarrollado mecanismos para absorber, transportar y utilizar nutrientes minerales en suelos no-salinos. Uno de los factores determinantes de la tolerancia celular a la salinidad reside en la capacidad de mantener en el citosol una alta relación de algunos iones con respecto al Na^+ , principalmente K^+/Na^+ . La entrada de K^+ y Na^+ en la célula se produce por la acción de transportadores y canales iónicos localizados en la membrana plasmática. Existen canales iónicos y transportadores muy selectivos para K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} , pero que también pueden facilitar la entrada de Na^+ , y pueden ser bloqueados por altas concentraciones de Na^+ en el medio (Maathuis y Amtmann, 1999; Rodríguez-Navarro, 2000), lo cual ocasiona la pérdida de selectividad de la membrana plasmática permitiendo una entrada significativa de Na^+ en la célula. Si se produce una entrada importante en el citosol, la relación K^+/Na^+ debe ser restablecida para evitar el efecto tóxico del Na^+ . Esto se consigue en muchas especies mediante sistemas de transporte (antiporte Na^+/H^+ , simporte K^+/Na^+) de alta y baja afinidad localizados en la plasmalema y en el tonoplasto que permite acumular Na^+ en la vacuola de manera activa (Demidchik et al., 2002; Zhu, 2003). De acuerdo a los resultados de este estudio, la tolerancia a la salinidad manifestada por el chile chiltepín, parece ser debida a su capacidad para sobrevivir con elevadas cantidades de Na^+ y Cl^- en sus hojas mediante

reparticiones intracelulares como lo realizan diversas halófitas y la glicófita cebada en la cual se ha demostrado su capacidad para tolerar altas concentraciones de Na^+ y Cl^- en los tejidos foliares (Colmer y Jackson, 2005), pero que nada tiene que ver con el mantenimiento de una elevada relación K^+/Na^+ en las hojas ya que esta relación disminuyó significativamente con el incremento de la concentración de NaCl en los tratamientos (Tabla 4). Inclusive, en el chile poblano, que fue severamente dañado por el estrés salino, se encontró que la relación K^+/Na^+ en las hojas solamente fue reducida significativamente cuando las plantas se expusieron a 300 mM de NaCl .

Aunque la tolerancia a salinidad manifestada en chile chiltepín no se pudo ligar a una mejora de la relación K^+/Na^+ , existen actualmente diversos estudios que han presentado información con respecto al incremento de la tolerancia a la salinidad mediante el aumento de la relación K^+/Na^+ , inclusive se están sugiriendo algunos genes implicados en este proceso como se ejemplifica a continuación. Un tipo de transportador de los iones Na^+ y K^+ bien reconocido es el perteneciente a la familia de los HKT, identificado y evaluado en *Arabidopsis* (Rus et al., 2004), arroz (Fukuda et al., 2004) y trigo (Laurie et al., 2002). El gen *Kna1*, candidato para la clásica discriminación K^+/Na^+ que fue descrito hace mas de 20 años por Gorham et al. (1987) es probablemente un gen HKT1;5 (Byrt et al., 2007). El gen *Kna1* fue asociado con una mayor relación de K^+/Na^+ en la hojas de trigo harinero lo cual le confirió una mayor tolerancia a la salinidad en comparación con algunos trigos tetraploides (Gorham et al., 1987). También existen buenas evidencias que un gen estrechamente relacionado, *TmHKT;4-A2*, es el gen candidato para la exclusión de Na^+ (*Nax1*) en trigo (Huang et al., 2006), el cual es asociado con la exclusión de Na^+ y una relación alta de K^+/Na^+ . A nivel celular, las elevadas cantidades de Na^+ y Cl^- que llegan a las hojas pueden ser toleradas por adaptaciones anatómicas y reparticiones intracelulares (Munns y Tester, 2008). En chile chiltepín es poco probable que su tolerancia se deba a una adaptación anatómica como la que emplean algunas halófitas al ser expuestas a concentraciones elevadas de salinidad, las cuales responden aumentando el tamaño de las células

por el incremento del volumen de las vacuolas (suculencia) o por la expulsión de Na^+ y Cl^- a través de glándulas especiales. Mas bien la tolerancia a la salinidad esta relacionada con la capacidad que tiene para repartir intracelularmente las cantidades excesivas de Na^+ y Cl^- que llegan a los tejidos foliares.

Staal et al. 1991 reportaron que una mayor eficiencia en la repartición intracelular de iones tóxicos como Na^+ y Cl^- puede ser la causa en las diferencias en tolerancia a la salinidad entre especies estrechamente emparentadas, como podría ser el caso entre chiltepín y poblano. La hipótesis anterior se soporta en que fue encontrado que el estrés salino induce una mayor actividad en el antiporte Na^+/H^+ en la especie tolerante a la salinidad *Plantago maritimo* que en la especie sensible *Plantago media* (Staal et al., 1991). Se ha reportado que un incremento del ion Cl^- , esta relacionado con bajos niveles de nitratos en los tejidos. El cloro inhibe la asimilación de los nitratos. En los tejidos el NO_3^- puede ser sustituido por el ion Cl^- a elevados niveles de salinidad (Larrinaga, 2001). En la mayoría de los casos, el aumento de la concentración de sales en el medio reduce la concentración de P en los tejidos de la plantas (Sharpley et al., 1992) Papadopoulos y Rending, (1983) mencionan que el ion Cl^- tiene un efecto negativo sobre la asimilación de fosfatos y acumulación en las raíces y hojas de tomate lo cual coincide con nuestros resultados de la variedad poblano.

Para la evaluación de la expresión de genes de chiltepín y chile poblano, en respuesta a estrés salino se realizó la extracción de ARN, la cuál es un proceso específico para cada organismo (Luque y Herráez, 2001) El aislamiento de ARN de alta calidad ha demostrado ser difícil en un gran número de especies de plantas, especialmente de pinos (Chang et al., 1993; Stokes et al., 1990) y algunas especies de la familia Solanaceae (Logemann et al., 1987). Rendimientos pobres, de baja calidad y degradados de ARN, puede ser el resultado de una ineficiente lisis celular o altos niveles de actividad de nucleadas, lo puede atenuarse utilizando agentes catárticos, como tiocianato de guanidina. Varios métodos han sido descritos para el aislamiento de ARN de las plantas. En la mayoría de los casos, se han empleado los detergentes SDS, extracción de

fenol, y precipitación con cloruro de litio (LiCl). Este problema en el aislamiento de ARN de alta calidad se da por la oxidación de metabolitos secundarios como compuestos fenólicos los cuales se acumulan en plantas superiores y en especial en tejidos maduros y la contaminación por polisacáridos (Chang et al., 1993)

Para la síntesis de ADN complementario (ADNc), se utilizaron dos enzimas: Improm (promega) y SuperScrip II Reversa Transcriptasa (Invitrogen) y los oligonucleotidos aleatorios (señalados en la metodología) los productos de la amplificación se analizó en un gel de acrilamida al 6%, sin observar ningún producto de amplificación. A pesar de que se probaron varias estrategias de amplificación (modificaciones en temperatura de alineación de los oligonucleotidos, número de ciclos y diferentes concentraciones de cloruro de magnesio) no se logró obtener ningún resultado. Cabe señalar que para todo el proceso y como una manera de saber que el resultado estaba asociado a la muestra y no al protocolo, se utilizó como control positivo el ARN de maíz., el cuál mostró un buen patrón de bandeo (datos no mostrados).

Estas dificultades para trabajar el ARN total de chiltepín, sugieren la existencia de palíndromos o secuencias autocomplementarias, las cuales pueden afectar a la estructura secundaria del ARN, formando estructuras en horquilla lo que dificulta la transcripción reversa. La gran diversidad de estructuras que se pueden observar tridimensionalmente en las moléculas de ARN, resulta de la combinación de estructuras secundarias locales, estabilizadas por enlaces de hidrógeno y por interacciones hidrofóbicas de apilamiento (Fig. 22). Es así como la naturaleza del ARN, puede determinar la facilidad o complejidad con que se obtenga la cadena complementaria de ADN.

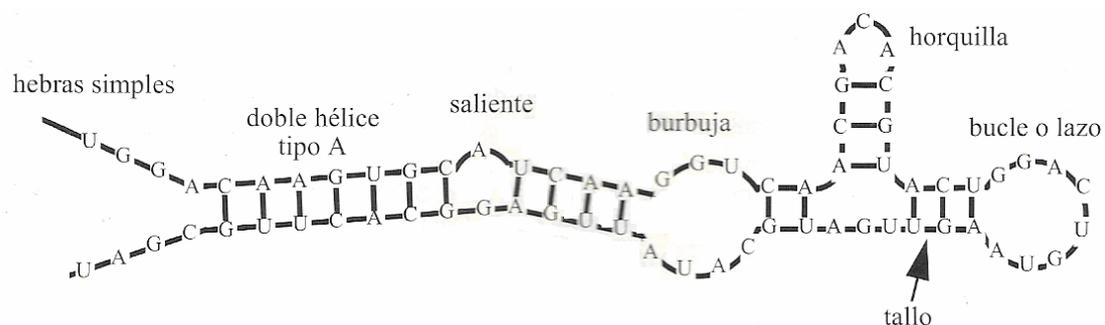


Figura 22. Estructuras que forman la cadena de ARN

Por lo anterior, se utilizó una enzima multifuncional (Sensiscrip Reverse Transcriptase, QIAGEN) con actividad de demostrada de ADN polimerasa dependiente de ARN, exoribonucleasa dependiente de híbrido DNA-ARN (ARNse H) y ADN polimerasa dependiente de ADN. Ésta enzima ya ha sido descrita por Bosch y Pardee en el 2000, para mejorar la calidad de formación de ADNc.

La técnica de despliegue diferencial (DD) es más sensible que otras técnicas para detectar bajos niveles de expresión debido a que utiliza herramientas como la transcripción reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Algunos artículos han publicado acerca de la clonación de ADNc usando el método de DD, por ejemplo, el relacionado estrés por ozono (Sharma y Davis 1995), maduración (Wilkinson et al., 1995) y peróxido de hidrógeno (Desikan et al., 2000). Estas publicaciones muestran que el DD es uno de los métodos más poderosos en la clonación de genes preferencialmente expresados en diferentes tejidos o muestras bajo diferentes condiciones.

Los resultados que se obtuvieron al emplear la técnica de DD en este trabajo de investigación nos permitió observar posteriormente de haber corrido la electroforesis los productos de PCR (bandas o amplicones) que estaban presentes solamente en una de las muestras. Si la banda está en la muestra control, pero no la muestra de organismos tratados, significa que dicho gen ha sido suprimido. Por el contrario, su presencia en los tratados, pero no en el control, es evidencia preliminar que dicho gen ha sido expresado por el tratamiento.

Los amplicones 14DDRP3, 23DDRP5, 2DDRP6 y el 20DDRP6 están intensamente expresados en el tratamiento B es decir, se expresaron por efecto de la inducción de estrés salino de respuesta tardía. Los amplicones 24 DD RP5 y 19 DD RP4 se suprimieron totalmente en los tratamientos A y B. Son amplicones que se apagan cuando las condiciones no son las óptimas o normales para el desarrollo del organismo. Los amplicones 17 DDRP3 y 25 DDRP6 se encuentran expresados en el control y el tratamiento A, lo que nos indica que son genes de respuesta temprana y que se suprimen cuando el estrés es por tiempo prolongado.

De los genes que se inducen por estrés salino en chiltepín (14DDRP3, 23DDRP5, 9, 14, 20 y 2 DDRP6), únicamente el 2DDRP6 sigue el mismo patrón de expresión en chile poblano, mientras que los 9, 14 y 20 DDRP6 siguen un patrón opuesto.

De los genes que se reprimen en chiltepín por estrés salino (19 DDRP4, 24 y 17 DDRP5, 25DDRP6), únicamente 19DDRP4 y 25DDRP6 tienen el mismo comportamiento en poblano, mientras que 24 y 17 DDRP5 tienen acción opuesta.

Por lo anterior, 24 y 17 DDRP5, 9, 14 y 20 DDRP6 pueden pertenecer a los genes que marcan la diferencia a la resistencia al estrés salino entre chiltepín y poblano. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Es una técnica muy eficiente y rápida para la amplificación de fragmentos de DNA o RNA específicos provenientes de todos los organismos vivos. La reacción sencilla de PCR utiliza un par de oligonucleótidos que flanquean la secuencia de DNA usado como molde, una DNA polimerasa termoestable y deoxinucleótidos o dNTPs. (Lewin, 1997) Los resultados obtenidos empleando oligonucleótidos que fueron diseñados para *Capsicum annuum L* nos ahorro tiempo y nos brindo información muy importante de la variedad chiltepín, esta variedad no cuenta con reportes de secuencias en las bases de datos y mucho menos con información de ESTs que son mas específicas a una respuesta por algún estímulo, empleando esta técnica generamos información de ESTs específicas a la salinidad las cuales fueron depositadas en la base de datos NCBI. Esta técnica también nos favoreció en la selección de genes que se colocaron en la evaluación por macroarreglos.

Es importante realizar RT-PCR, Souther Blot o PCR Tiempo Real para confirmar los datos obtenidos sugeridos.

Caffeoil-CoA-metiltransferasa: Un fragmento de 190 pb del mARN de caffeoil-CoA-metiltransferasa de chiltepín, presentó una identidad del 99% con *C. annum* L tipo guajillo, La comparación de las secuencias nucleotídicas mostró 9 pb de bases diferentes (figura 20, panel A). Estas diferencias modifican en 2 posiciones la secuencia de aminoácidos del péptido para el cuál codifica, cambiando de glicina y arginina en chiltepín a cisteína y lisina en chile guajillo.

La enzima caffeoil-Coenzima A O-metiltransferasa (CCoAoMT) transfiere grupos metilo de la S-adenosil-L-metionina al anillo aromático de monolignoles, para catalizar caffeoil CoA en feruluil-CoA (Hoffmann et al., 2001). Estos metabolitos están involucrados en la reacción de defensa de la planta al sintetizar ácido ferúlico que se une a la pared celular, inhibiendo la penetración del patógeno (Schmitt et al., 1991; Ye et al., 1994; Busam et al., 1997). Es una enzima clave para la biosíntesis de lignina, la CCoAOMT desempeña un papel dominante en la metilación del grupo 3-hidroxilo de caffeoyl CoA, y la reacción de metilación mediada por CCoAOMT es esencial para canalizar los sustratos para la 5-methoxylation de hydroxycinnamates. Se ha demostrado que la represión de antisentido CCoAOMT genera árboles con bajo contenido de lignina. (Ruiqin Zhong, et al; 2000). Estudios realizados con células en suspensión de *Petroselinum crispum*, (Pakusch A, and Ulrich 1990), observaron que la Vmax. de CCoAMT se estimulo con sal y etanol. Este podría ser el resultado de sitios hidrófobos de la enzima, que deben ser expuestos para la máxima actividad catalítica. La similitud en la secuencia de aminoácidos de CCoAMT del motivo -GG- que están rodeados de residuos hidrofóbicos (-IGGLIGY-) fueron reconocidos previamente en uno de los dominios conservados de las AMTs (amino transferasas) (Ingrosso D, et al; 1989, Lauster R; 1989). Este motivo puede contribuir a la modulación de la actividad de la enzima in vitro a la adición de sal o

etanol. CCoAMT cataliza una reacción que es importante para muchas de las células de las plantas en estrés.

En nuestro estudio, la expresión del gen que codifica para una CCoAoMT, se observó en los tratamientos A y B así como en el control para ambas variedades (Tabla VI). Al hacer un análisis de los nucleótidos secuenciados y convertirlos en proteína encontramos el motivo GGLIGY, a este motivo le han asignado la función para modular concentraciones de sal en las células.

Acetolactato sintetasa: Un fragmento de 189 pb del ARNm de acetolactato sintetasa de chiltepín presentó una identidad del 95% en 190/250 bases (Fig. 20 panel B) con *C. annum* L tipo guajillo. Acetolactato sintasa (ALS, EC 4.1.3.18), también conocida como acetohidroxiácido (AHAS), cataliza la oligonucleotidosa reacción de la ruta de la biosíntesis de aminoácidos. La enzima acetolactato sintetasa cataliza la condensación de dos moléculas de piruvato en acetolactato en la biosíntesis de valina y leucina o la condensación de piruvato y 2-oxobutirato a acetohidroxiacetato en la biosíntesis de isoleucina (Alan K et al., 1997). La sobreexpresión del gen que codifica ALS en plantas de *A. thaliana*, confiere resistencia contra el herbicida sulfonil-urea (Haughn et al., 1988).

En éste estudio, se detectó el gen de acetolactato sintetasa en chiltepín control y en la expresión temprana de genes (tratamiento A, Tabla VI), no se observaron amplicones en expresión tardía. Se ha encontrado la expresión de este gen en plantas halófitas como *Kochia scoparia* (Suzanne I. et al., 2008) y *Thellungiella halophila* (Teruaki Taji et al., 2008). Lo que nos hace pensar que la expresión de esta enzima juega un papel importante en plantas que viven en condiciones de alta concentración de sales ya que los aminoácidos desempeñan una importante función nutritiva en la germinación, así como en la síntesis de proteínas, en la formación de fitohormonas, en la regulación del balance hídrico y sobre todo como moléculas quelantes de cationes necesarios para el desarrollo vegetal o de desintoxicación, entre otras funciones.

Nitrito reductasa: Un fragmento de 262 pb del mARN (Fig. 20, panel C) de chiltepín presentó una identidad del 100% con *C. annum* L tipo guajillo. Esta

enzima (NR, EC 1.6.6) participa en la ruta metabólica de la reducción de nitrógeno para generar compuestos nitrogenados o aminoácidos. Trabajos previos han reportado los efectos negativos del estrés salino en el metabolismo del nitrógeno. El estrés salino inhibe la asimilación de amonio e induce cambios en el pool de aminoácidos afectando así la regulación del crecimiento de la planta. (M. Debouba et al., 2007). Podemos decir que el chiltepín muestra la expresión de esta enzima en forma temprana y tardía lo que nos lleva a pensar que es una forma de tolerar mejor altas concentraciones de NaCl sin verse afectado su crecimiento.

Factor de transcripción de la caja MADS: Un fragmento de 186 pb del mRNA MADS-box transcription factor (panel D) de chiltepín presentó una identidad del 100% con *C. annuum* L tipo guajillo. La caja MADS es una familia de genes que codifica factores de transcripción, conserva un dominio llamado MADS-box. Estos genes omnipresentes en los organismos vivos, disponen de una amplia gama de funciones. El análisis genético ha revelado que en la mayoría de ellos su función está relacionada con el control de la floración, desarrollo de órganos reproductores y crecimiento vegetativo (Becker y Theissen, 2003). Shinyoung Lee en el 2008 elucidó el papel que juega OsMADS26, un miembro de la AGL12 grupo. Incrementaron los niveles de transcripción de OsMADS26 en plantas transgénicas de arroz (*Oryza sativa*) y *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*), la sobre expresión de este gen se mostró en fenotipos relacionados con las respuestas de estrés, como la clorosis, la muerte de las células, la acumulación de pigmento y el crecimiento defectuoso de raíz / vástago.

Además usando microarreglos demostró que los genes de biosíntesis del jasmonato, etileno, y especies reactivas de oxígeno, estaban reguladas por la sobre expresión de OsMADS26. Estos resultados sugieren que OsMADS26 induce múltiples respuestas que se relacionan con diversos estresores. En nuestro trabajo es importante la expresión de este gen en el control así como en los tratamientos de chiltepín ya que debido a esta participación la planta no se ve afectada en el crecimiento.

Adenosilmetionina descarboxilasa: Un fragmento de 56 pb del mARN adenosylmethionine decarboxylase de chiltepín presentó una identidad del 100% en 56/182 bases (Fig. 20 panel E) con *C. annum* L tipo guajillo.

La enzima S-adenosil metionina descarboxilasa (SAMDC) cataliza la reacción de descarboxilación de la S-adenosil metionina (SAM) a la forma descarboxilada de SAM (dcSAM), que es el precursor de la síntesis de espermidina, espermina y etileno. Se ha reportado que la SAMDC es regulada por una amplia variedad de estímulos fisiológicos, hormonales y ambientales (Evans y Malmberg, 1989). Dependiendo de la planta, se han encontrado desde una copia del gen de la *samdc* (cebada) hasta cuatro genes diferentes (mostaza); sin embargo, no hay reportes de la caracterización de SAMDC en Chile (Dresselhaus et al., 1996; Hu et al., 2005). Nosotros observamos que el gen de la *samdc* en el chiltepín fue inducido fuertemente por los tratamientos de estrés salino (A y B) no así en el control lo que nos puede estar indicando que el chiltepín expresa este gen solo cuando existe un cambio en su metabolismo basal. El gen de la *samdc* en Chile poblano se expresa en el control y el tratamiento de expresión temprana, en la evaluación de respuesta tardía vemos que este gen se suprimió.

Proteína inducida por TMV: Un fragmento de 353 pb del ARNm una proteína inducida por TMV de chiltepín presentó una identidad del 98% en 349/354 bases (Fig. 20 panel F) con *C. annuum* (Número de acceso en GenBank: [AF480414](#)). La interacción de *Capsicum annuum* con virus del mosaico del tabaco (TMV) inducen la expresión del gen CaTin1 (Takemoto et al., 2001). Ryoung Shin en el 2004 demostró que CaTin1 interfiere con el balance redox de las plantas uno de los oligonucleotidosos mecanismos de respuesta a etileno, estresores bióticos y abióticos, que ayudan a mantener la homeostasis. En nuestro trabajo encontramos la expresión de este gen en el tratamiento de expresión tardía lo que nos indica se pueden estar generando antioxidantes, que permite a la planta mantener a las proteínas y otros componentes celulares, en un estado activo para el metabolismo y así evitar daños en las células. (Christine H. Foyer, 2005)

La tecnología de macroarreglos es un elemento importante en el estudio en la obtención de nuevos genes para el mejoramiento de plantas, en investigaciones sobre la fisiología de los cultivos entre otras muchas.

El análisis de la expresión de genes es importante puesto que los cambios en la fisiología de un organismo están determinados por los cambios implicados en el patrón original de la expresión del gen. El análisis de la expresión puede usarse para obtener una visión de las consecuencias fisiológicas de las modificaciones genéticas de las plantas. En este estudio evaluamos algo parecido ya que la variedad silvestre de chiltepín es el progenitor de la variedad domesticada poblano, a simple vista podemos observar un cambio morfológico muy drástico así que a nivel de genes debe de existir el mismo cambio o de forma inversa el poblano tenga en su genoma genes que debido al proceso de domesticación apago o perdió. Y como observamos en los resultados obtuvimos información importante que nos abre un abanico de opciones a seguir evaluando y confirmar nuestra hipótesis.

La participación de dichas enzimas en el estrés salino se puede definir en los siguientes términos:

Esterasas: Son enzimas que forman o hidrolizan enlaces ester. Entre todas destaca la pectin-metil-esterasa, la cual esta implicada en la posibilidad de las pectinas para interaccionar con moléculas de calcio, regula también la acidez de las pectinas. También controla la accesibilidad de determinadas enzimas a las pectinas. Si las pectinas están metiladas hay muchas glucanasas (enzimas) que no las pueden atacar. Las pectinas se caracterizan por su capacidad para formar geles y son muy importantes como sustancias cementantes en la lamina media y en la pared celular. Las cadenas de los polisacáridos que constituyen las pectinas establecen interacciones no covalentes formando una red tridimensional en la que quedan atrapadas moléculas de agua con la consiguiente formación de un gel. Las características de ese gel dependen de la longitud y el tamaño de los poros de la red. Las regiones de la pectina o ácido galacturónico que no se encuentran esterificadas pueden interaccionar formando estructuras denominadas cajas de

huevos. Estas estructuras (caja de huevos) tienen mucha importancia a nivel de la lámina media en la adhesión celular y por lo tanto de la integridad de los tejidos. La desesterificación de las pectinas, permite el aumento de la rigidez por la formación de enlaces de calcio (Goldberg, 1984). En nuestro trabajo bajo estrés por salinidad es muy importante la acción de este grupo de enzimas ya que los resultados nos muestran como chiltepín en el control no presenta la expresión de estas enzimas por que las condiciones no las requieren pero cuando existe un factor diferente en el medio se expresan para ayudar a que la pared celular mantenga su estructura evitando así la entrada de patógenos, tolerar el déficit iónico e hídrico que genera este fenómeno, manteniendo la turgencia y la elongación de la planta.

Acetolactato sintetasa: Participa en la biosíntesis de aminoácidos. Recientemente, se ha encontrado que la enzima JA-amino sintetasa (JAR1) forma JA (ácido Jasmonico) conjugado con diversos tipos de aminoácidos, tales como leucina (JA-Leu), isoleucina (JA-Ile), fenilalanina (JAPhe) y valina (JA-Val). La conjugación de JA con aminoácidos es necesaria para una señalización óptima de algunas respuestas en Arabidopsis (Staswick y Tiryaki, 2004). En la década pasada, los JAs fueron propuestos como señales que participan en respuestas de las plantas a una gran variedad de factores bióticos y abióticos, así como en diversos procesos del desarrollo (Creelman y Mullet, 1995; Wasternack y Hause, 2002). El JA juega un papel muy importante como precursor del etileno. Estas investigaciones nos muestran la importancia de esta enzima a la respuesta del estrés salino aplicado en nuestro trabajo ya que al producir aminoácidos que juegan un papel importante en las funciones del JA y este a su vez es clave en el metabolismo del etileno que no solo tiene función como precursor de la maduración de frutos, existen otros procesos fisiológicos donde se ha estudiado la posible implicación del etileno; estudios con plántulas de chicharo han permitido demostrar que esta hormona hace que se mantenga la inclinación del ápice del tallo y se prevenga el crecimiento de las hojas. Así, se ha sugerido su implicación en respuesta a los procesos de estrés en general, como por ejemplo,

el estrés térmico, estrés mecánico o estrés abiótico (Xu et al., 1995). Esta cadena de funciones metabólicas y bioquímicas pueden explicar un poco por que no se ve afectado el crecimiento y desarrollo de la planta de chiltepín. (Resultados de parámetros fisiológicos).

Inhibidor de la disociación GDP o GDI: Es una proteína que interviene en el ciclo de las GTPasas las cuales funcionan como reguladores maestros en células eucariotas. Estas proteínas sufren modificaciones postraduccionales por prenilación y carboximetilación, esta modificación contribuye a su incorporación a la membrana citoplasmática. La unión al GTP activa a la proteína y la hidrólisis a GDP la inactiva (asociada a un regulador GDI inhibidor). Este ciclo a su vez es regulado por GEFs (Efectores Intercambiadores de guaninonucleótido); éstos a su vez son controlados por señales externas. (Aktories y Barbieri, 2005). La proteína G una vez activada, puede activar un canal iónico (lo abre o lo cierra), con lo que cambia el potencial iónico de la membrana y por ello, esto se usa en la sinapsis. Otras veces pueden activar o inhibir enzimas y concretamente sobre las adenilato ciclasa (que convierte el ATP en AMPc) y sobre la fosfolipasa C (que es un tipo de fosfolípido de la membrana, debido al inositol, que son hidrolizados y producen inositol trifosfato y diacilglicerol).

Inositol trifosfato: Se libera al citoplasma. Se dirige hasta el retículo endoplasmático y liberará Ca_2^+ desde este mediante la apertura de canales dependientes de ligando (IP3). Después se separa y se destruye. Se formarán tantos IP3 como se pueda durante el tiempo que la fosfolipasa está activa.

Diacilglicerol: Se queda en la membrana y activa una proteína quinasa (por que necesita Ca_2^+ liberado por IP3), esta quinasa C activa, fosforilará proteínas.

Cuando se abre un canal de Ca_2^+ , este entra en la célula por gradiente de concentración. El calcio puede activar canales iónicos dependientes de calcio o bien se va a unir a la calmodulina que sin Ca_2^+ está inactiva. La calmodulina al activarse, va a activar proteínas kinasas (kinasas Ca-M) la cual fosforilará proteínas. Este mecanismo parece estar muy relacionado con la memoria. Por

tanto, el calcio debería bajar sus niveles, lo cual lo hace por la ATPasa de calcio, pero también puede salir por un intercambiador Na^+Ca_2^+ .

DEA1: Philip D. Weyman y colaboradores en el 2005 aislaron el gen DEA1 de DNAC de tomate (*Solanum lycopersicum*) bajo tratamiento con ácido arachidónico. Para obtener más información sobre la regulación transcripcional de DEA1, la región promotora inversa se clonó por PCR y se caracterizó. El análisis de la región promotora de DEA1 se realizó usando el programa Genomatix MatInspector el cual utiliza una colección de sitios de factores de transcripción, sitios de unión para formar una matriz de secuencias para encontrar motivos a lo largo de un gen. Los resultados tienen similitud del 80 al 100% con los promotores de la matriz. Una de las características más prominentes de DEA1 es su regulación por los ritmos circadianos. Debido a la presencia de varios elementos como GATA CCA1 Otro tipo de respuesta a estrés que los motivos predicen en el promotor DEA1 incluye W-box en respuesta al ataque por patógenos y senescencia, el Afil-1 un motivo en respuesta a estrés salino y el ABA una hormona que se expresa en respuesta a estrés

Subunidad α de E1 de la piruvato deshidrogenada: Subunidad α de E1 de la piruvato deshidrogenada forma parte de un complejo molecular conocido como Complejo Piruvato Deshidrogenasa (PDC) este complejo se encuentra en las células de las plantas en la mitocondria donde participa en el ciclo del ácido cítrico y en los cloroplastos donde produce el acetil CoA y el NADH que se requiere para la biosíntesis de los ácidos grasos e isoprenoides. El complejo molecular está formado por 2 polipeptidos E2 de 76 KD y E3 de 57 KD además de 2 subunidades denominadas E1 α de 43 KD y E1 β de 38.5 KD (Luethy M.H et al., 1996). Sherry LeClere en el 2004 identificó y caracterizó el gen *iar4* en *Arabidopsis* el cual es un homólogo de la subunidad E1 α de la piruvato deshidrogenada mitocondrial, que convierte el piruvato a acetil-coenzima A. En este trabajo comprobaron que *IAR4* interviene en la conversión de indol-3-piruvato a indol-3-acetil-coenzima A, que es un posible precursor de indol-3-ácido acético (AIA). La formación y la hidrólisis de AIA representan un medio importante

por el cual las plantas pueden regular los niveles de IAA y por tanto la respuesta de las auxinas. Las auxinas afectan prácticamente todos los aspectos de desarrollo de la planta, incluyendo fototropismo, gravitropismo, la expansión celular, dominancia apical, el crecimiento de las raíces, el desarrollo de los frutos, desarrollo vascular y la senescencia.

VIII. CONCLUSIONES

El chiltepín (*C. annuum* var. *glabriusculum*), a diferencia del chile poblano (*C. annuum* var. *annuum*), posee mecanismos fisiológicos y morfométricos para responder al estrés salino tales como: disminución de la transpiración, acumulación de ion Na⁺ en las hoja, crecimiento de raíz y mantenimiento del área foliar. De igual manera, *C. annuum* var. *annuum* y var. *glabriusculum*, poseen genes que se expresan diferencialmente (presencia-ausencia) en etapa temprana y tardía (bandas 24 y 17 DDRP5, 9, 14 y 20 DDRP6) y genes que se expresan en menor o mayor intensidad ante los estímulos de salinidad. Lo anterior puede estar involucrados en las diferencias a la resistencia al estrés salino entre chiltepín y poblano.

Se observó que las variedades silvestres poseen un genoma más complejo que permite guardar más celosamente su información genética, lo cual muy probablemente tenga que ver con su capacidad de tolerar y/o resistir altas concentraciones de NaCl sin que su desarrollo y crecimiento se vea afectado.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Adams Patricia, John Thomas C, Vernon Daniel M., Bohnert Hans J. and Jensen Richard G. 1992. Distinct Cellular and Organismic Responses to Salt Stress. *Plant and Cell Physiology*. Vol. 33, No. 8 1215-1223.
- Aktorics K and Barbier J.T. 2005. Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nature Reviews Microbiology*. 3, 397-410
- Alan Chang K and Duggleby R G. 1997. Expression, purification and characterization of *Arabidopsis thaliana* acetohydroxyacid synthase. *Biochem J*. 1; 327(Pt 1): 161–169.
- Bancomext. 1999. <http://www.bancomext.com.mx>
- Barkla Bronwyn J. and Pantoja Omar 1996. Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. Vol. 47: 159-184.
- Becker Annette and Theißen Günter. 2003. The major clades of MADS-box genes and their role in the development and evolution of flowering plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. Vol. 29, Issue 3, Pages 464-489.
- Benavides Mendoza A. 2002. *Ecofisiología y Bioquímica del estrés en plantas*, departamento de horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Buenavista, Saltillo, COAH. México.
- Bernstein L, Francois LE and Clark R. 1974. Interactive effects of salinity and fertility on yields of grains and vegetables. *Agron J*. 66:412-421.
- Besnier Romero F. 1989. Growth and development Seed production. *Plant physiology*. p. 629-637.
- Blumwald Eduardo, Apse Maris and Sottosanto Jordan B. 2001. Vacuolar cation/H⁺ exchange, ion homeostasis, and leaf development are altered in a T-DNA insertional mutant of AtNHX1, the *Arabidopsis* vacuolar Na⁺/H⁺ antiport. *The Plant Journal*. Vol. 36 Issue 2, Pages 229 – 239.
- Bolarin M.C.; Cano E.A.; Perez-Alfocea F.; Caro M. 1991. Effect of NaCl priming on increased salt tolerance in tomato. *Journal of Horticultural Science*. Vol. 66(5) p. 621-628.
- Briens M. and Larher F. 1992. Osmoregulation in halophytic higher plants: a comparative study of soluble carbohydrates, polyols, betaines and free proline. *Plant Cell & Environment*. Vol. 5 Issue 4, Pages 287 – 292.
- Burdon J.J and Jarosz A.M. 1989. Wild relatives as sources of disease resistance. En: Brown A.H.D., Frankel O.H., Marshall D.R. and Williams J. T. Edrs. *The Use of Plant genetic resources*. Cambridge University Press, Cambridge. pp. 280-296.
- Busam H., Kassemeyer H. and Matern U. 1997. Differential Expression of Chitinases in *Vitis vinifera* L. Responding to Systemic Acquired Resistance Activators or Fungal Challenge. *Plant Physiology*. Vol. 115, Issue 3 1029-1038.

- Byrt Caitlin S. J., Damien Platten, Wolfgang Spielmeier, Richard A. James, Evans S. Lagudah, Elizabeth S. Dennis, Mark Tester and Rana Munns. 2007. HKT1;5-Like Cation Transporters Linked to Na⁺ Exclusion Loci in Wheat, Nax2 and Kna1. *Plant Physiology*. 143:1918-1928.
- Chang S, Pryear J and Caimey J. 1993. A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Mol Biol. Rep* 11: 113-117.
- Cheeseman John M. 1988. Mechanisms of Salinity Tolerance in Plants. *Plant Physiology*. 87:547-550.
- Christine H. Foyer. 2005. Redox Homeostasis and Antioxidant Signaling: A Metabolic Interface between Stress Perception and Physiological Responses. *The Plant Cell*. 17:1866-1875.
- Colmer T. D. and Jackson B. 2005. Response and Adaptation by Plants to Flooding Stress. *Annals of Botany*. 96(4):501-505.
- Colmer Timothy D., Timothy J. Flowers and Rana Munns. 2006. Use of wild relatives to improve salt tolerance in wheat. *Journal of Experimental Botany*. 57(5):1059-1078.
- Creelman R A and Mullet. 1995. Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. National Acad Sciences. 92, pp. 4114-4119.
- Cuartero J, M., Bolarín C., Asíns M. J. and Moreno V. 2006. Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany*. 57(5):1045-1058.
- Cushman John C and Bohnert Hans J. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Plant Biology*. Vol. 3, 117-124.
- Debouba Mohamed, Houda Maâroufi-Dghimi, Akira Suzuki, Mohamed Habib Ghorbel and Houda Gouia. 2007. Changes in Growth and Activity of Enzymes Involved in Nitrate Reduction and Ammonium Assimilation in Tomato Seedlings in Response to NaCl Stress. *Annals of Botany*. 99(6):1143-1151.
- Demidchik Vadim and Mark Tester. 2002. Sodium Fluxes through Nonselective Cation Channels in the Plasma Membrane of Protoplasts from Arabidopsis Roots. *Plant Physiol*. Vol. 128, pp. 379-387.
- Desikan Radhika, Steven J. Neill and Hancock John T. 2000. Hydrogen peroxide-induced gene expression in Arabidopsis thaliana. *Free Radical Biology and Medicine*. Vol. 28, Issue 5, Pages 773-778.
- Dresselhaus Thomas, Barcelo Pilar, Hagel Christine, Horst Lörz and Klaus Humbeck. 1996. Isolation and characterization of a Tritordeum cDNA encoding S-adenosylmethionine decarboxylase that is circadian-clock-regulated. *Plant Molecular Biology*. Vol. 30.
- Evans P T, and Malmberg R L. 1989. Do Polyamines Have Roles in Plant Development? *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. Vol. 40: 235-269.
- FAO (2005). Global network on integrated soil management for sustainable use of salt-affected soil. <http://fao.org/aq/AGL/agll/spush/intro.htm>.

- FAO (2008) Food and agriculture organization of the United Nations agricultural. <http://apps.fao.org/faostat/>.
- Flowers T J, Troke PF, and Yeo AR. 1977. The Mechanism of Salt Tolerance in Halophytes. *Annual Review of Plant Physiology*. Vol. 28: 89-121.
- Fukuda A., Nakamura A., Tagiri A., Tanaka H, Miyao H, Hirochika H and Tanaka Y. 2004. Function, intracellular localization and the importance in salt tolerance of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter from rice. *Plant Cell Physiol*. 45, 146-159.
- García Alfonso F, Montes Hernández Salvador y Rangel Lucio J. Antonio. 2004. Calidad fisiológica de la semilla de chile piquín (*Capsicum annuum* var. *aviculare*) de dos localidades de Querétaro, Mejoramiento y Recursos Genéticos Primera Convención Mundial del Chile. pag. 49-53.
- Garthwaite, Alaina J. Roland von Bothmer and Timothy D. Colmer. 2005. Salt tolerance in wild *Hordeum* species is associated with restricted entry of Na⁺ and Cl⁻ into the shoots. *Journal of Experimental Botany*. 56(419):2365-2378.
- Goldberg Renée. 1984. Changes in the properties of cell wall pectin methylesterase along the *Vigna radiata* hypocotyl. *Physiologia Plantarum*. Vol. 61 Issue 1, Pages 58 – 63.
- Gorham J, Hardy C, Jones Wyn R G, and Joppa L R. 1987. Chromosome location of a K/Na discrimination character in the D genome of wheat. *Theor appl Genet*. 74, 584–588.
- Greenway H and Munns R. 1980. Mechanisms of Salt Tolerance in Nonhalophytes. *Annual Review of Plant Physiology*. Vol. 31: 149-190.
- Hanks R. J. 1983. Yield and water-use relationships: an overview. P 393-417. In: Taylor H. M., Jordan W. R. and T. M. Sinclair (eds.). *Limitations to Efficient Water Use in Crop Production*. Am. Soc. Agron. 538 p.
- Harlan J.R. 1976. Genetic resources in wild relatives of crops. *Crop Science*. 16:329-333.
- Hasegawa P.M., Bressan R.A., Zhu J.-K. & Bohnert H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 51, 463–499.
- Haughn George W., Smith Barbara Mazur and Somerville Chris. 1988. Transformation with a mutant *Arabidopsis* acetolactate synthase gene renders tobacco resistant to sulfonylurea herbicides, sulfonylurea herbicide. *Molecular and General Genetics MGG*. 266-271
- Hernández-Verdugo S, Aranda P D, Oyama K. 1999. Síntesis del conocimiento taxonómico, origen y domesticación del género *Capsicum*. *Bol. Soc. Bot. Mex.* no. 64. 65-84.
- Hernández-Verdugo S., Guevara-González R.G, Rivera-Bustamante R F, Oyama K. 2002. Screening wild plants of *Capsicum annuum* for resistance to pepper huasteco virus: presence of viral DNA and differentiation among populations. *Euphytica*. 22:31-36.
- Hewitt EJ. 1963. Nutrition of plants in culture media. In: Steward FC, ed. *Plant physiology*. Vol. III. Inorganic nutrition of plants. New York, London: Academic Press, 97–360.

- Hoffmann L, Maury S, Bergdoll M, Thion L, Erard M, Legrand M. 2001. Identification of the enzymatic active site of tobacco caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 276: 36831–36838.G.
- Hu Wen-Wei, Haibiao Gong and Eng Chong Pua. 2005. The Pivotal Roles of the Plant S-Adenosylmethionine Decarboxylase 5' Untranslated Leader Sequence in Regulation of Gene Expression at the Transcriptional and Posttranscriptional Levels. *Plant Physiology*. 138:276-286
- Huang Shaobai, Wolfgang Spielmeier, Evans S. Lagudah, Richard A. James, J. Damien Platten, Elizabeth S. Dennis and Munns Rana. 2006. A Sodium Transporter (HKT7) Is a Candidate for Nax1, a Gene for Salt Tolerance in Durum Wheat. *Plant Physiology*. 142:1718-1727.
- Inan Günsu, Quan Zhang, Pinghua Li, Zenglan Wang, Ziyi Cao, Hui Zhang, Changqing Zhang, Tanya M. Quist, S. Mark Goodwin, Jianhua Zhu, Huazhong Shi, Barbara Damsz, Tarif Charbaji, Qingqiu Gong, Shisong Ma, Mark Fredricksen, David W. Galbraith, Matthew A. Jenks, David Rhodes, Paul M. 2004. Salt Cress. A Halophyte and Cryophyte Arabidopsis Relative Model System and Its Applicability to Molecular Genetic Analyses of Growth and Development of Extremophiles. *Plant Physiology*. 10.pp.104
- Ingrosso D, Fowler AV, Bleibaum J and Clarke S.1989. Sequence of the D-aspartyl/L-isoaspartyl protein methyltransferase from human erythrocytes. Common sequence motifs for protein, DNA, RNA, and small molecule S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *J. Biol. Chem.*, Vol. 264, Issue 33, 20131-20139.
- Jacoby B. 1994. Mechanisms involved in salt tolerance by plants. In: Pessaraki M., ed. *Handbook of plant and crop stress*. New York: Marcel Dekker. Pp 97-123
- Jeschke W. D, Wolf O, Munss R and Tonnet M L. 1984. The Role of the Stem in the Partitioning of Na⁺ and K⁺ in Salt-Treated Barley. *Journal of Experimental Botany*. Vol. 42, Number 6 Pp. 697-704.
- Jeschke, W.D.1984. K⁺-Na⁺ exchange at cellular membranes, intracellular compartmentation of cations, and salt tolerance. *Plant physiology and biochemistry*. p. 37-66.
- Jones M.M, and Turner N.C. 1980. Turgor maintenance by osmotic adjustment, a review and evaluation in adaptation of plants to water and high, high temperature stresses. *Interscience*. 87-103.
- Kafkafi U G. 1987. Phosphorus Adsorption by Kaolinite and Montmorillonite: II. Organic Anion Competition. *Soil Science Society of America*. 52: 1585-1589
- Klepper Betty, Belford R K, and Rickman RW. 1987. Studies of Intact Shoot-Root Systems of Field-Grown Winter Wheat. II. Root and Shoot Developmental Patterns as Related to Nitrogen Fertilizer. *American Society of Agronomy*. 79:310-319.
- Laborde J y Pozo O. 1982, *Pasado y Presente del Chile en México*. SARH-INIA. Publicación Especial N° 85. México.

- Larcher W. 1995. Plants Under Stress. In: Physiological Plant Ecology. Ecophysiology and Stress Physiology of Functional Groups. 3ed. Springer-Verlag, Berlin. p. 321-448.
- Larrinaga Mayoral J.A. 2001. Efecto del NaCl sobre la fisiología, crecimiento y producción en plantas de Chile *Capsicum Annuum* L. Tesis Doctoral. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste. La Paz, B.C.S. México.
- Laurie E, Feeney K, Maathuis F, Heard P, Brown S and Leigh R. 2002. A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *The Plant J.* 32(2), 139-154.
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stress. 2nd. edition. Academic Press, New York.
- Lauster R. 1989. Evolution of type II DNA methyltransferases: a gene duplication model. *Journal of molecular biology* vol. 206, no2, pp. 313-321.
- Lewin, B. 1997. Genes VI. Oxford University Press, Oxford.
- Lira Saldivar R.H. 2003. Fisiología Vegetal. Trillas.
- Logemann J, Schell J, Willmitzer L. 1987. Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Anal Biochem.* 15;163(1):16-20
- Luethy Michael H., Jan A. Miernyk and Douglas D. Randall. 1996. The mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex: nucleotide and deduced amino-acid sequences of a cDNA encoding the *Arabidopsis thaliana* E1 α -subunit. *Gene.* Vol. 164, Issue 2, Pages 251-254.
- Luque Cabrera José y Herráez Miguel Ángel. 2001. Biología Molecular e Ingeniería Genética : conceptos, técnicas y aplicaciones. Madrid, Harcourt,. 2001. 469 p.
- M. Ashraf and Harris P J C. 2003. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science.* Vol. 166, Issue 1, 4, Pages 3-16
- Maas EV and Hoffman G J. 1977. Crop salt tolerance: Current assessment. *J, Irrig. Drainage Div. ASCE* 103 (IR2), 115-134.
- Maas EV. 1986. Salt tolerance of plants. *Applied Agricultural Research* 1:12-26.
- Maathuis Frans J. M. and Anna Amtmann. 1999. K+ Nutrition and Na+ Toxicity: The Basis of Cellular K+/Na+ Ratios. *Annals of Botany.* 84: 123-133.
- Michael C. Shannon. 1994. Advances in agronomy. Vol. 60. Academic Press, Adaptation of plants to salinity.
- Munns R. and Termaat A. 1986. Whole-plant responses to salinity. *Aust J Plant Physiol.* 13:143-160.
- Munns Rana and Tester Mark. 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology.* Vol. 59: 651-681.
- Munns Rana and Tester Mark. 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology.* Vol. 59: 651-681.
- Nielsen DR. *Am. Soc. Agronomists, Monograph* 30: 1089-1142.
- Ollat N., M. Fermaud, J.P., Tandonnet, and M. Neveux. 1998. Evaluation of an indirect method for leaf area index determination in the vineyard: Combined effects of cultivar, year and training system. *Vitis* 37(2):73-78.

- Pakusch Anne-Elisabeth and Ulrich Matern. 1990. Kinetic Characterization of Caffeoyl-Coenzyme A-Specific 3-O-Methyltransferase from Elicited Parsley Cell Suspensions. *Plant Physiology*. 96:327-330
- Papadopoulos, I. and Rending V.V. 1983. Interactive effects of salinity and nitrogen on growth and yield of tomato plants. *Plant and Soil*, 73: 47-57.
- Pardo José M., Cubero Beatriz, Leidi Eduardo O and Quintero Francisco J. 2006. Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* 57(5):1181-1199.
- Pickersgill B. 1969. The Archaeological Record of Chili Peppers (*Capsicum* Spp.) and the Sequence of Plant Domestication in Peru. *Society for American Archaeology*. Vol. 34, Pag. 54-61
- Pickersgill B. 1971. Relationships between weedy and cultivated forms in some species of chili peppers (genus *Capsicum*). *Evolution*. 25:683-691
- Pimienta Barrios E., Muñoz A, Ramirez B.C. y Mendez L. 2006. Desarrollo Vegetal, Universidad de Guadalajara. 332 pag.
- Puebla Andrea F.; Del Viso, Florencia. 2004. Capítulo 12. Tolerancia a factores abióticos. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*.
- Rengasamy Pichu. 2002. Transient salinity and subsoil constraints to dryland farming in Australian sodic soils: an overview. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 42, 351–361.
- Rhoades J.D and Loveday J. 1990. Salinity in irrigated agriculture. In *American*
- Rodríguez-Navarro A. 2000. Potassium transport in fungi and plants *biophysica Acta (BBA)*. Reviews on Biomembranes. Volume 1469, Issue 1, 10, Pages 1-30.
- Ruiqin Zhong, W. Herbert Morrison III, David S. Himmelsbach, Farris L. Poole II, and Zheng-Hua Ye. 2000. Essential Role of Caffeoyl Coenzyme A O-Methyltransferase in Lignin Biosynthesis in Woody Poplar Plants. *Plant Physiology*. Vol. 124, pp. 563-578.
- Rus AM, Estañ MT, Gisbert C, Garcia-Sogo B, Serrano R, Caro M, Moreno V, Bolarin MC. 2001. Expressing the yeast HAL1 gene in tomato increases fruit yield and enhances K⁺/Na⁺ selectivity under salt stress. *Plant Cell Environ*. 24:875–880.
- Rus Ana, Byeong-ha Lee, Muñoz-Mayor Alicia, Altanbadralt Sharkhuu, Kenji Miura, Zhu Jian-Kang, Ray A. Bressan and Paul M. Hasegawa, 2004, AtHKT1 Facilitates Na⁺ Homeostasis and K⁺ Nutrition in Planta. *Plant Physiology*. 136:2500-2511.
- Ryoung Shin, Jong-Min An, Chang-Jin Park, Young Jin Kim, Sunjoo Joo, Woo Taek Kim and Kyung-Hee Paek. 2004 *Capsicum annuum* Tobacco Mosaic Virus-Induced Clone 1 Expression Perturbation Alters the Plant's Response to Ethylene and Interferes with the Redox Homeostasis. *Plant Physiology*. 135:561-573.
- Sairam RK and Tyagi A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants .Vol. 86 No 3, 407-421.
- Salisbury Frank B. and Cleon W. Ross. 1994. *Fisiología Vegetal*, México, Grupo editorial Iberoamérica. 795 pag.

- Sambrook, E.F Fritsch, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold spring harbor laboratory press.
- Sanders Dale, Jérôme Pelloux, Colin Brownlee and Jeffrey F. Harper . 1999. Calcium at the Crossroads of Signaling. *The Plant Cell*, Vol. 14, S401-S417
- Schmitt D, Pakusch D E and Matern U. 1991. Molecular cloning, induction and taxonomic distribution of caffeoyl-CoA 3-O-methyltransferase, an enzyme involved in disease resistance. *J. Biol. Chem.*, Vol. 266, Issue 26, 17416-17423
- Shannon M.C. and Noble C.L. 1990, Genetic approaches for developing economic salt-tolerant crops, *Agricultural salinity assessment and management*.
- Shannon M.C.; Gronwald J.W.; Tal, M.1987. Effects of salinity on growth and accumulation of organic and inorganic ions in cultivated and wild tomato species, *Journal of the American Society for Horticultural Science*. Vol. 112(3) p. 416-423.
- Shannon MC. 1996. New insights in plant breeding efforts for improved salt tolerance. *Salt management workshop proceedings*. HortTech 6:96-99.
- Sharma Y K , Léon J, Raskin I, Davis K R. 1995. Ozone-induced responses in *Arabidopsis thaliana*: the role of salicylic acid in the accumulation of defense-related transcripts and induced resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 10 :5099-104.
- Sharpley A.N, Smith S.J., Jones O.R., Berg W.A., Coleman G.A. 1992. The transport of bioavailable phosphorus in agricultural runoff. *Journal of environmental quality*. Vol. 21 (1), p. 30-35.
- Sherry LeClere, Rebekah A. Rampey and Bonnie Bartel. 2004. IAR4, a Gene Required for Auxin Conjugate Sensitivity in *Arabidopsis*, Encodes a Pyruvate Dehydrogenase E1 Homolog. *Plant Physiology*. 135:989-999
- Shi H., Ishitani M., Kim C. and Zhu, J.-K. 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc. Natl. Acad. Sci. US*. 6896–6901.
- Shinji Kawasaki, Borchert Chris, Deyholos Michael, Wang Hong, Brazille Susan, Kiyoshi Kawai, Galbraith David and Bohnert Hans J. 2001. Gene Expression Profiles during the Initial Phase of Salt Stress in Rice.
- Shinyoung Lee, Choi Sang Chul; And Gynheung. 2008. Rice SVP-group MADS-box proteins, OsMADS22 and OsMADS55, are negative regulators of brassinosteroid responses. *Plant Journal*. p 93-105.
- Silberbush M, and Ben-Asher J. 1987. The effect of salinity on parameters of potassium and nitrate uptake of cotton. *Comm in Soil Sci Plant Anal*. 18:65-81.
- Smirnoff N and Cumbes Q. J. 1989. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. *Phytochemistry*. Vol. 28, no4, pp. 1057-1060.
- Society of Civil Engineers, *Irrigation of Agricultural Crops* (Steward BA and Staal, M.; Maathuis F.J.M.; Elzenga, J.T.M. 1991. Over-beek, j.h.m. & prins, h.b.a. Na⁺/H⁺ antiport activity in tonoplast vesicles from roots of the salt-tolerant *Plantago maritima* and the salt-sensitive *Plantago media*. *Physiologia Plantarum*. 82(2):179-184.

- Stalker H.T. 1980; Utilization of wild species for crop improvement, advances in agronomy. vol 30.
- Staswick Paul E. and Tiryaki Iskender. 2004. The Oxylinin Signal Jasmonic Acid Is Activated by an Enzyme That Conjugates It to Isoleucine in Arabidopsis. *The Plant Cell*. 16:2117-2127.
- Stokes SB, Rugh CL, and Kamalay JC. 1990. RNA and DNA isolation from recalcitrant plant tissues. *Biotechniques* 9: 268-272.
- Suzanne I. Warwick, Renlin Xu, Connie Sauder, and Hugh J. Beckie. 2008. Acetolactate Synthase Target-Site Mutations and Single Nucleotide Polymorphism Genotyping in ALS-Resistant Kochia (*Kochia scoparia*). *Weed Science*. 56(6):797-806.
- Takemoto Daigo , Noriyuki Doke and Kawakita Kazuhito. 2001. Characterization of Elicitor-inducible Tobacco Genes Isolated by Differential Hybridization. *Journal of General Plant Pathology*. Vol. 67. Number 2.
- Teruaki Taji, Tetsuya Sakurai Keiichi Mochida, Atsushi Ishiwata, Atsushi Kurotani, Yasushi Totoki, Atsushi Toyoda, Yoshiyuki Sakaki, Motoaki Seki, Hirokazu Ono, Yoichi Sakata, Shigeo Tanaka and Kazuo Shinozaki. 2008. Large-scale collection and annotation of full-length enriched cDNAs from a model halophyte, *Thellungiella halophila*. *BMC Plant Biology* 2008. 8:115.
- Trejo-Vázquez I. 1999 . El clima de las selva baja caducifolia en México, *Investigaciones Geográficas*. Boletín 39 (1999), pp. 40–52.
- Verdugo-Hernandez S., Guevara-González R.G, Rivera-Bustamante R.F.,Vázquez-Yanes C., Oyama K.. 1998. Los parientes silvestres del chile (*Capsicum* spp.) como recursos genéticos. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 62:171-181.
- Vinocur Basia and Altman Arie. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Plant Biotechnology*. 123-132.
- Wasternack C and Hause B. 2002. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development, *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* Escrito por Kivie Moldave, Inc NetLibrary, Kivie Moldave. Publicado por Academic Press. 485 pág.
- Welles J.M and Norman J.M. 1991. Instrumental for indirect measurement of canopy architecture. *Agron. J.*83, 818-825.
- Weyman Philip D., Zhiqiang Pan, Qin Feng, David G. Gilchrist and Richard M. Bostock. 2005. A Circadian Rhythm-Regulated Tomato Gene Is Induced by Arachidonic Acid and *Phytophthora infestans* Infection. *Plant Physiology* 140:235-248.
- Wilkinson, D.G., 1992. Situ Hybridization: A Practical Approach. In: , IRL Press, Oxford, pp. 75–82
- Xiong, L. and Zhu, J.-K. 2001. Salt stress signal transduction in plants. In: *Plant Signal Transduction*. D. Scheel and C. Wasternack eds. Oxford University Press. pp 168-197

- Xu Y., Chang PFL, Liu D, Narasimhan M. L, Raghothama K. G., Hasegawa P. M. and Bressan R. A. 1994. Plant Defense Genes Are Synergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate. *The Plant Cell*. Vol 6, Issue 8 1077-1085.
- Ye Z. H., R. E. Kneusel, U. Matern and Varner J. E. 1994, An Alternative Methylation Pathway in Lignin Biosynthesis in *Zinnia*. *The Plant Cell*. Vol 6, Issue 10 1427-1439.
- Zhu J, L Xiong, K Schumaker. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *The Plant Cell*. S 165-S183.
- Zhu Jian-Kang. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science*. Vol. 6, Issue 2, Pages 66-71.
- Zhu, J.-K., Xiong, L. and Liu, J. 2000. Positional cloning of a salt tolerance locus. In *Plant Tolerance to Abiotic Stresses in Agriculture: Role of Genetic Engineering*. J.H. Cherry, R.D. Locy, and A. Rychter (eds.) Kluwer Academic Publishers, Germany.

X. ANEXOS

Anexo 1: Metodología para extracción de RNA

Las muestras de hoja se cortaron de la planta e inmediatamente se colocaron en nitrógeno líquido para evitar la degradación del RNA por RNAsas. Aproximadamente 200 mg de hojas se homogenizaron con mortero y Nitrógeno Líquido y un 1 ml de solución TRI PURE.

1. Se centrifugo a 12000g/10 min/4°C transfirió el sobrenadante.
2. Se Incubo a temperatura ambiente durante 5 min.
3. Se adiciono 200 µl de cloroformo y se agito en vortex por 15 segundos.
4. Se incubo la muestra a temperatura ambiente por 10 min.
5. Se centrifugo a 12,000g/15 min/ 4°C.
6. Se tomo la fase incolora y se paso a un tubo nuevo estéril.
7. Se adicionaron 500 µl de isopropanol, se agito en vortex e incubamos 8 min., a temperatura ambiente para permitir la precipitación del ARN.
8. Se centrifugo a 12000g/ 10 min/ 4°C.
9. Se descanto el sobrenadante y se lavo la pastilla o pellet con 1 ml de etanol al 75% a -20°C. y agitando en vortex. (Hasta despegar la pastilla).
10. Se centrifugo a 7,500 rpm por 5 min. a 4°C y se descarto el sobrenadante.
11. Se seco la pastilla o pellet a temperatura ambiente por 10 min.
12. Se resuspendió el ARN en agua con DEPC (puede ser de 10 a 30 µl).
13. Y se precipito con 40 µl LiCl₂ 4M con la finalidad de eliminar los carbohidratos, lipidos y polifenloes; inmediatamente se le agrego 250 µl de etanol absoluto y se almaceno a -20°C toda la noche.
14. Se centrifugo a 12000g/15min./4°C se decanto el sobrenadante.
15. Se centrifugo a 7,500 rpm por 5 min. a 4°C y se descarto el sobrenadante.
16. Se seco la pastilla o pellet a temperatura ambiente por 10 min.
17. Finalmente se resuspendió la pastilla en agua tratada DEPC (10 a 30 µl).
18. La integridad del RNA se comprobó en un gel de agarosa 1%. Se pesaron 0.25g agarosa y se le agregaron 21.8 ml de agua DEPC y 2.5 ml de buffer MOPS 10X en un matraz erlermeyer libre de RNAsas se agregaron 2.5µl de SYBR SAFE 10000X y se calentó en microondas para solubilizar. Se enfrió a 55 °C y se le agrego 1 ml de formaldehído al 37%, se vació en una placa libre de RNAsas y se coloco el peine.
19. Se desnaturalizaron las muestras de RNA aproximadamente 5µg, se le agregaron 3 µl de buffer de carga con formaldehído y 9 µl de agua DEPC se mezclo y se coloco a 65°C por 5 min. e inmediatamente se transfirió a hielo.
20. En una cámara para electroforesis libre de RNAsas se coloco buffer 1X MOPS y se coloco la placa con el gel, se retiro el peine y se lavaron los pozos con el buffer 1X MOPS y se cargaron 15 µl de muestra.
21. La electroforesis corrió a 80 V por 30 min. y se verificaron las bandas en un fotodocumentador.

Anexo 2: Reacción en cadena de la polimerasa se realizó con Advantage® 2 PCR Kit.

A 25 µl de volumen final siguiendo lo indicado en la tabla de reacción.

Solución	concentración	Microlitros
H ₂ O para PCR		18.25
Advantage 2 PCR Buffer	10X	2.5
MgCl ₂	25 mM	0.75
50X dNTP Mix	10 mM	0.5
Primer de anclaje	10 µM	0.5
Primer aleatorio	10 µM	0.5
cDNA	100ng/ µl	1
Advantage2 Polimerasa mix	50 X	0.5

Las condiciones de amplificación fueron: Una desnaturalización inicial de 94°C, 4 min, seguido de 40 ciclos de 94°C/ 30 seg; 43°C/ 1 min y 68°C, 1 min, terminando con 72°C, 5 minutos. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta su análisis electroforético.

Anexo 3: Electroforesis

1.- En vidrios especiales para despliegue diferencial 20 x 45 cm. se colocaron 80 ml de la solución (acrilamida-urea (6%- 7M), 400 µl de APS 10% y 40 µl de TEMED), se colocó el peine y se dejó polimerizar por 1 h.

2.- La cámara de electroforesis se llenó con buffer TBE 1 X.

3.- Se colocaron los vidrios con el gel ya polimerizado y se precalentó a 1800 V por 1 h. con la finalidad de que el gel alcance una temperatura de 50-55°C

Esto con la finalidad de mantener los productos de PCR desnaturalizados.

4.- Mientras se calentó el gel los productos de PCR (3 µl de cada uno) y 3 µl de buffer de carga 2X (agua destilada, azul de bromofenol 0.05%, azul de xilencianol 0.05%, formamida 95% y EDTA 0.5M) se desnaturalizaron por 5 min a 94 °C e inmediatamente se colocaron en hielo.

5.- Una vez obtenida la temperatura del gel, se cargaron en los pozos los productos de PCR y se corrió la electroforesis hasta que el azul de bromofenol alcance la base del gel (2 h aproximadamente a 1800 V).

6.- Desmontó el gel se removió cuidadosamente el vidrio con la muesca y se prosiguió con el método de tinción.

Para más información ver manual de Técnicas de Biología molecular del laboratorio de Biología Molecular de plantas y Patogénesis microbiana CIBNOR.

1.- El primer paso es el Fijado el cual se realizó: con una solución de etanol 10% y ácido acético al 0.5% en un litro de agua destilada, se le dio un tiempo con agitación de 3 min.

2.- El impregnado lleva una solución de Nitrato de plata al 2 % en un litro de agua destilada y se agitó por 5 min.

3.- Se hace un lavado con agua destilada de 10 seg.

4.- El último paso es el desarrollo de color que lleva una solución de 15 g de hidróxido de sodio, 2 ml de formaldehído al 37%, en un litro de agua destilada, este paso final las bandas se comienzan a ver en aproximadamente 8 min. y se puede para el oscurecimiento del gel con la solución de fijado.

Anexo 4: Elusión de amplicones, clonación y secuenciación.

- 1.- Las bandas o amplicones que se obtuvieron en la tinción del gel se cortaron cuidadosamente y se colocaron en un tubo eppendorf de 2 ml y se siguió con el protocolo del manual Clontech.
 - 2.- Se agregaron 20 µl de agua miliQ a cada amplicon y se calentaron (100°C, 5 min.)
 - 3.- Se centrifugaron por 5 min. A 12000 rpm y se transfirió el sobrenadante.
 - 4.- Reamplificación de las bandas por PCR. En un tubo de PCR se colocaron 2 µl del DNA eluído, se le adiciona la mezcla maestra de la tabla 1 y los primer que se utilizaron son los indicados para cada hilera donde se corto la banda recordando que había 8 aleatorios y el de anclaje APG.
 - 5.- Las condiciones de amplificación fueron: Una desnaturalización inicial de 94°C, 4 min., seguido de 40 ciclos de 94°C/ 30 seg; 43°C/ 1 min y 72°C, 2 min, terminando con 72°C, 5 minutos. Las muestras se almacenaron a 4°C
 - 6.- Se corrió un gel de agarosa al 1 % para visualizar los productos de PCR.
 - 7.- De los productos que dieron positivo se procedió a realizar la reacción de ligación usando el vector PGEM.
 - 8.- La mezcla de la reacción es la siguiente 5 µl de buffer de ligación 2X, 1 µl del vector PGEM Easy, 3 µl de producto de PCR y 1 µl de T4 DNA ligasa.
 - 9.- Para obtener una mejor eficiencia se dejaron incubando por 12 h a 4°C
 - 10.- Posteriormente se realizo la transformación utilizándose células *E.coli* DH5α las cuales se hicieron competentes. De la siguiente forma:
 - 11.- 3 ml de medio LB se inocularon con la bacteria y se dejaron a 37°C/24hrs/200rpm.
 - 12.- 50 ml de medio LB se inocularon con 500 µl de la suspensión anterior y se dejan incubando a 37°C/ 3hrs/200rpm.
 - 13.- Mientras se preparo el CaCl₂ 0.1 M se filtra en condiciones estériles.
 - 14.- Una vez transcurrido el tiempo de la suspensión se centrifugo a 4000rpm/4°C/10min se decanto el sobrenadante y se le agregaron 10 ml de CaCl₂ 0.1 M se resuspendieron en hielo. Y se centrifugaron a 4000rpm/4°C/10min se decanta el sobrenadante.
 - 15.- Se repitió el paso 14 pero esta vez con 2 ml de CaCl₂
 - 16.- Se colocaron 50 µl de las células competentes en un eppendorf de 2 ml y se les agrego 1 µl de la reacción de ligación se mezclaron muy gentilmente y se dejaron reposar en hielo por 30 min. Para que las cargas se atraigan.
 - 17.- Se aplico un shock térmico de 42°C por 45 seg. e inmediatamente se pusieron en hielo por 2 min. Con la finalidad de que el plasmido entre a la bacteria.
 - 18.- Se agregaron 250 µl de medio SOC y se incuban a 37°C/1h/200rpm.
 - 19.- Mientras se inocularon las cajas petri (con agar LB y ampicilina 100mg/ml) con 20 µl de IPTG 100mM y 40 µl de X-Gal 50µg/ µl.
 - 20.- Una vez concluido el tiempo de incubación se inocularon las placas antes mencionadas con 75 µl de la suspensión de bacteria ya transformada.
 - 21.- Se deja en incubación por 24h/ a 37 °C
 - 22.- Después de las 24 hrs aparecen colonias azules y blancas.
- Aislamiento rápido de DNA plasmídico "Miní preps"
- Reactivos y soluciones
- Solución I glucosa 50 tris HCl 25 mM pH 8, EDTA 10mM.
- Solución II o mezcla de lisis: SDS 1% NAOH 0.2 (preparar al momento de usar).
- Solución III acetato de sodio 3M pH 5.2 (se utiliza fría).
- Ribonucleasa RNAsa : Ribonucleasa A pancreática 10mg
- Etanol al 70%, isopropanol

-TE: Tris -HCl 10 Mm , EDTA 1Mm , pH 8 (se agrega 1µl de RNAsa por ml de TE, al momento de usar).

- 1.- Se tomaron 1.5 ml de cultivo bacteriano que contenía la clona de interés (LB caldo con ampicilina) y se centrifugo por 5 min./12000 g a temperatura ambiente.
- 2.- Se removió el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 250 µl de la solución I y se mezcló bien.
- 3.- Se agregaron 250 µl de solución II y se espero de 4 a 10 min. a que la solución se viera transparente.
- 4.- Se agregaron 250 µl de solución III fría (colocada en hielo) y se incubo en hielo por 15 min.
- 5.- Se centrifugo 10 min/12000g/temperatura ambiente.
- 6.- Se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio (aprox. 700 µl) y agregar 700 µl de isopropanol a temperatura ambiente.
- 7.- Se Centrifugo a 30 min/12000/ g/temperatura ambiente.
- 8.- Se removió el sobrenadante y se lavo el pellet con 300 µl de etanol al 70%.
- 9.- Se centrifugo 2min/12000g/temperatura ambiente se removió el etanol por decantación teniendo cuidado de no perder el pellet.
- 10.- Se repitió el lavado con etanol al 70% como en paso 8 y 9
- 11.- Se seco el pellet con vacío o al aire.
- 12.- Se resuspendió el pellet en 50 µl de TE con RNAsa

El paso siguiente es enviar el material a secuenciar por lo que se tiene que purificar los plásmidos.

- 1.- Se resuspendió el pellet en un volumen de 200 µl con agua bi destilada.
- 2.- Se agregó 1 volumen de la solución de Sevag (Cloroformo:alcohol isoamilico, 24:1) y se mezcló suavemente en el vortex hasta formar una emulsión opaca.
- 3.-Se centrifugo a 12000 rpm/7 min.
- 4.-Se tomó la fase superior acuosa que contiene los plásmidos y se paso a un tubo nuevo de 1.5 ml.
- 5.- Se agrego 1 volumen de la solución de Sevag a la fase acuosa recuperada y se agito suavemente en el vortex hasta formar la solución opaca.
- 6.- Se centrifugó a 12000 rpm/ 7 min.
- 7.- Se repitieron los pasos del 4 a 6.
- 8.-Se tomo la fase acuosa y se trasfirió a un tubo limpio de 1.5 ml.
- 9.-Se agregaron 2.5 volúmenes de etanol absoluto (frío) y 1/25 de NaCl 5M se mezcló suavemente por inversión.
- 10.- Se colocó toda la noche a -20°C
- 11.- Se centrifugó a 10 000 rpm/ 10 min.
- 12.- Se eliminó el sobrenadante y se lavó 2 veces el pellet con 1 ml de etanol al 70% (frío), seguido de centrifugación a 100000 rpm durante 5 min.
- 13.- Se elimino el sobrenadante, se seco y se resuspendió el DNA plasmidico en agua milli Q estéril. Y se almaceno a -20°C hasta su uso.

Anexo 5: Reacción en Cadena de la Polimerasa

Solución	concentración	Microlitros
H ₂ O		19.65
Buffer PCR	10X	2.5
MgCl ₂	50 mM	0.75
dNTP Mix	10 mM	0.5
Primer F	20 μM	0.5
Primer R	20 μM	0.5
cDNA		1
Platinum Taq DNA polymerase HF	5 U/μl	0.1
Vf		25

Las condiciones de amplificación fueron: Una desnaturalización inicial de 94°C, 4 min, seguido de 34 ciclos de 94°C/ 30 seg; 59°C/ 1 min y 68°C, 1 min, terminando con 72°C, 3 minutos. Las muestras se almacenaron a 4°C hasta su análisis electroforético.

Anexo 6: Preparación y cuantificación de la sonda

- 1.-En un microtubo se colocó 5 μg de RNA total, mas 3.6 μL de agua DEPC junto con 0.4 μL de cada nucleótido dATP 25 mM, dCTP 25 mM, dGTP 25 mM , bajando la concentración a 0.1 μL del dTTP 25 mM, con la finalidad de que el DIG-dUTP se incorpore en el lugar del dTTP al momento de llevar a cabo la síntesis de cDNA. Para esto se agregó 1.4 μL de dig-dUTP (1mmol/μL),
- 2.-Posteriormente se le agregó 1 μL del Oligo dt.
- 3.- Y se incubó a 65°C por 5 minutos para desnaturalizar el RNA.
Esto para que se empiece a sintetizar la cadena complementaria al RNA, cuando el oligo dT se una por complementariedad a la cadena poliadenilada de los mRNAs.
- 4.- Una vez transcurrido el tiempo se retiraron, se colocaron en hielo y se agregaron 4 μL del 5X RT Buffer 2 μL de DTT 0.1 M y 1 μL de RNase OUT (40 unidades/μL) y se colocó a 42°C durante 2 minutos.
- 3.- Posteriormente se le agregó 1 μL de SuperScript™ (50 unidades/μL) y se incubó a 42°C durante 50 minutos.
- 4.-Ya transcurrido el tiempo se paró la reacción a 70°C durante 15 minutos.
- 5.-Después se le agrega 1 μL de la mezcla de RNasa H con una concentración de 10 μg/μL, se incubó a 37°C durante 20 minutos.
- 6.- finalmente se mantiene a -20°C.

Anexo 7: Cuantificación de la sonda por quimioluminiscencia.

Primeramente se evaluó la eficiencia de la sonda para así ajustar la cantidad necesaria de material para la hibridación.

1.-Se cortó una membrana de Nylon Hybond (cargada positivamente) Se prepararon diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} , Se puso 1 μ L de cada dilución de cada una de las sondas de cDNA sintetizadas, colocando de la mas concentrada a la menos concentrada de arriba hacia abajo.

2.- Posteriormente se fijaron las sondas de cDNA, en luz UV a 300 m Joules en un Crosslinker 1000 ultraviolet VVP.

3.- Ya fijado el DNA a la membrana se pasó a una bolsa de plástico con 7 a 10 mL de solución de bloqueo 1X, de manera que esta solución cubra la membrana, se eliminaron las burbujas y se sello la bolsa (este proceso se hace para cada vez que se cambie el buffer), esto se dejó durante 30 minutos con agitación.

4.- Después se incubo la membrana con 7 a 10 mL de solución de anticuerpo anti-digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina (1 μ L de anti-DIG-conjugado por cada 5 mL de solución de bloqueo) durante 30 minutos con agitación.

5.- Posteriormente se lavó la membrana 2 veces durante 15 minutos cada lavado con 20 mL del buffer de lavado (buffer de ácido maleico, 0.3% Tween 20(v/v)).

6.- Se equilibró la membrana con 15 mL de buffer de detección (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5, 20°C), dejándola sumergida de 2 a 5 minutos con agitación.

7.-Se le agregó el sustrato quimioluminiscente para la fosfatasa alcalina, CDP-Star (Roche) diluido 1:1000 (1 μ L de CDP-Star en 999 μ L de buffer de detección), se incubó 5 minutos en oscuridad.

8.- Posteriormente se colocó dentro del cassette de revelado junto con la película de rayos X (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche) y se le dio un tiempo de exposición de 20 minutos.

9.-Se pasó la película a la solución reveladora durante 2 minutos para desarrollar el color.

10.-Después se lavó con agua destilada por 2 min.

11.-Se pasó a la solución fijadora por 2 minutos.

12.- Se lavo con agua destilada por 2 min.

13.-Se dejó secar la película de rayos X.

Todo esto se hizo en total oscuridad.

Anexo 8: Hibridación

Una vez teniendo los productos de PCR inmovilizados en la membrana, esta se prehibrida (se colocó la membrana dentro de una bolsa de plástico se le añade el buffer y se eliminaron las burbujas para poder sellar la bolsa y ponerla en agitación este proceso se repite en cada cambio de buffer).

1.-Se le agregó 2 mL de solución de hibridación sin sonda y se selló y se colocó a 65°C durante 1 hora con agitación constante.

La cantidad de solución de hibridación se estimó tomando en cuenta el área de la membrana ya que en el protocolo original del Dig DNA Labeling and Detection Kit (Roche Applied Science, Cat.No.11175033910) se estipula que se agrega 20 mL/100 cm².

Mientras transcurría el tiempo de pre-hibridación, se desnaturalizó la sonda, colocándola durante 5 minutos en agua hirviendo e inmediatamente después, en hielo para evitar que la sonda se renaturalice.

1.- Después de haber transcurrido una hora, la membrana se sacó de la bolsa, se paso a otra bolsa en donde se le agregó 2 ml de solución de hibridación a 65°C, a la cual se le agregó la sonda (el calculo de la sonda esta en los resultados) y se mezcló se coloco a hibridar con agitación constante y una temperatura de 65°C toda la noche.

Lavado de post hibridación

Es importante recordar que en cada cambio de buffer se eliminan las burbujas antes de sellar la bolsa.

1.- Se lavó 2 veces con el buffer de lavado 1X el cual contiene 2X SSC, 0.1% SDS por 5 minutos a temperatura ambiente.

2.-Después se lavó 2 veces con el buffer de lavado 2 el cual contiene 1X SSC, 0.1% SDS (precalentada) y se incubo por 15 minutos a 68°C.

3.-Se lavo la membrana por 5 min en amortiguador de lavado.

4.- Lavar con solución de bloqueo 1X (20 ml para una membrana de 7x8 cm), de manera que esta solución cubra la membrana, se incubo por 1 hora con agitación.

5.- Después se incubo la membrana con solución de anticuerpo anti-digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina (1 µL de anti-DIG-conjugado por cada 5 mL de solución de bloqueo) durante 30 minutos con agitación.

6.- Posteriormente se lavó la membrana 2 veces durante 15 minutos cada lavado con 10 mL del buffer de lavado (buffer de ácido maleico, 0.3% Tween 20(v/v)) para una membrana de 7x8 cm.

Anexo 9: Detección por quimioluminiscencia

1.- Se equilibró la membrana con 15 mL de buffer de detección (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5, 20°C), dejándola sumergida 10 minutos con agitación.

2.-Posteriormente se le agregó el sustrato quimioluminiscente para la fosfatasa alcalina, CDP-Star (Roche) diluido 1:1000 (1 µL de CDP-Star en 999 µL de buffer de detección), se incubó 5 minutos en oscuridad. 3.- Y posteriormente se colocó dentro del cassette de revelado junto con la película de rayos X (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Roche) y se le dio un tiempo de exposición de 20 minutos.

4.-Se pasó la película a la solución reveladora (2 minutos) para desarrollar el color.

5.-Después se lavó con agua destilada por 2 min.

6.-Se pasó a la solución fijadora por 2 minutos.

7.- Se lavo con agua destilada por 2 min.

8.-Se dejó secar la película de rayos X.

Todo esto se hizo en total oscuridad.