



**UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**"PATRONES DE EXPRESIÓN DE GENES DE RESPUESTA AL
ESTRÉS HÍDRICO EN PLÁNTULAS DE *Quercus*
castanea (FAGACEAE) SOMETIDAS A NIVELES CONTRASTANTES
DE RIEGO".**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGO**

PRESENTADO POR:

p.Q.F.B. SERGIO ELIEZER LÓPEZ HERNÁNDEZ

ASESOR DE TESIS

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

ANTONIO GONZALEZ RODRÍGUEZ

MORELIA MICHUACÁN; ENERO DE 2013



Dedicado a mis padres Lucio y Rosario

AGRADECIMIENTOS

El apoyo económico para la presente investigación fue proporcionado por el fondo sectorial SEMARNAT-CONACYT de investigación sobre cambio climático, a través del proyecto No. 23728 "Análisis de la base genético-molecular de caracteres adaptativos clave de los encinos mexicanos (género *Quercus*) ante escenarios de cambio climático global, para su manejo y conservación".

Ya que este trabajo no es realizado por un solo individuo, reconozco de forma personal a:

Dios, mis padres Lucio y Rosario por darme la vida.

Mis hermanos Yaremi, Gerald y Obed por alegrarme la vida.

Mis amigos Mario, Fili y Hermi por su compañía.

Al Dr. Antonio González Rodríguez por su acertada asesoría y por permitir realizar investigación en su laboratorio.

Al Dr. Ken Oyama por permitir realizar mis experimentos en su laboratorio.

Al Dr. Víctor Rocha y la Señora Lolita por su paciente asesoría.

A mis amigos y compañeros Magy, Vane, Chucho, Sel, Cindy, Lete, Aly, María, Pato, Nando, Fany, Mariana, Sweet candy y Clement del laboratorio de Genética de la conservación por su compartir su sabiduría y experiencia conmigo.

CONTENIDO

1.	RESUMEN.....	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
2.1.	El ambiente y los factores de estrés.....	2
3.	ANTECEDENTES	3
3.1	Función de la proteína precursora de transferencia de lípidos (LTP)	5
3.1.1	Componentes de la cutícula vegetal.....	5
3.1.2	Las proteínas LTP y su rol en la formación de cutícula.....	6
3.2	Función del factor de unión 2 al promotor Dc3 (DPBF)	7
3.2.1	Embriogénesis de semillas.....	7
3.2.2	Factor de unión 2 al promotor Dc3 (DPBF2)	8
3.3	Función de la proteína betaína aldehído deshidrogenasa (BADH)	8
3.3.1	Protección osmótica contra la pérdida de agua	9
3.4	Función de la proteína glutatión S-transferasa (GST)	10
3.4.1.	Mecanismos de protección contra el estrés oxidativo: El glutatión.....	11
3.4.2.	Glutatión S-transferasa como promotor de detoxificación	12
3.5.	Multifuncionalidad de la familia de proteínas Oxigenasa 2OG-Fe(II)	12
3.6	Función de la enzima precursora de Tiazol biosintético (THI)	13
3.6.1	La proteína THI y su rol dual de protección en daños en el ADN mitocondrial.....	14
3.7	Función de las proteínas de shock térmico (HSP).....	15
3.7.1	Las proteínas de shock térmico como chaperonas moleculares	16
3.7.2	La proteína cognada de shock térmico 80 (HScP80).....	16
3.8	El cambio climático global y sus efectos	17
4.	JUSTIFICACIÓN.....	21
5.	HIPÓTESIS.....	22
6.	OBJETIVO GENERAL	23
6.1.	Objetivos Específicos	23
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
7.1	Material biológico.....	24
7.1.1.	Tratamiento para obtención de datos fisiológicos y colecta de muestras biológicas foliares	24
7.1.2.	Tratamiento para obtención de datos fisiológicos y colecta de muestras biológicas radiculares	25
7.2.	Extracción de ADN genómico.....	25
7.3.	Extracción de ARN total	26
7.4.	Amplificación de fragmentos de los genes de interés	27
7.5.	Secuenciación de ADN	29
7.6.	Síntesis de ADN de cadena sencilla	29

7.7.	Validación del método para cuantificación relativa	30
7.8.	Cuantificación relativa (qPCR).....	31
8.	RESULTADOS	32
8.1.	Amplificación de fragmentos de genes	32
8.2	Análisis de secuencias.....	35
8.3	Mediciones de fisiología.....	37
8.4	Resultados de la validación del método de análisis.....	43
8.5	Resultados de los análisis de expresión relativa	43
9.	DISCUSIÓN	46
10.	CONCLUSIONES	49
11.	LITERATURA CITADA.....	50
12.	APENDICE DE RESULTADOS.....	60
12.1.	Gráficas de los resultados de validación	60
12.2.	Gráficas de los resultados de la expresión relativa por tiempo de muestreo	69

1. RESUMEN

Frente a condiciones climáticas adversas como la falta de agua y el estrés foto-oxidativo, las plantas tienden a responder de diversas formas, y bajo estas condiciones los niveles de protección de los diversos mecanismos se incrementan pudiendo ser críticos para su supervivencia. En este trabajo se utilizaron plántulas de *Quercus castanea* (Fagaceae) sometidas a dos tratamientos de riego: 1) riego óptimo y, 2) sin riego hasta fenecer, para analizar y comparar los cambios temporales en la expresión relativa de tres genes, los cuales fueron elegidos entre siete en total, de acuerdo a un trabajo previo realizado por Porth et al. (2005b), y a los resultados de validación de los primers utilizados. Estos tres genes fueron la proteína de transferencia de lípidos (*ltp*), la enzima precursora de tiazol biosintético (*thi*), y la proteína cognada de shock térmico 80 (*hspc80*). Simultáneamente, como indicador fisiológico del estrés hídrico, se monitorearon las funciones de intercambio de gases de las plántulas de ambos tratamientos, particularmente los niveles de fotosíntesis, transpiración y conductancia estomática, mediante un sistema Analizador de Gases Infrarrojo (IRGA). Los resultados mostraron que conforme en el tratamiento sin riego progresó el estrés hídrico, la fotosíntesis, la conductancia estomática y la transpiración disminuyeron significativamente en comparación con las plántulas con riego óptimo. De igual forma, los niveles de expresión de los tres genes estudiados se incrementaron significativamente en las plántulas estresadas. En las raíces, la expresión de los tres genes también se incrementó, aunque en menor medida que en los tejidos aéreos. Por lo tanto, concluimos que la expresión activa de estos genes en hojas y raíces es parte importante de la respuesta ante condiciones de sequía.

2. INTRODUCCIÓN

Las adaptaciones de los organismos comienzan a nivel molecular y celular, donde los cambios en el ambiente son detectados y las respuestas a estos son finalmente consumadas en términos fisiológicos, bioquímicos, estructurales, morfológicos, etc. Para entender mejor estos procesos tenemos que profundizar un poco en como suceden las interacciones entre el ambiente y los organismos, analizando situaciones extremas dado que es aquí en donde las respuestas se hacen más evidentes, al grado de poder cuantificarlas eficientemente.

2.1. El ambiente y los factores de estrés

La palabra ambiente proviene del latín que significa "rodear", es decir todo el entorno en el cual se desarrolla una planta es su ambiente. El ambiente suele estar compuesto por varios factores individuales, a los cuales se les ha denominado factores ambientales bióticos si estos poseen vida, como por ejemplo otros organismos con los que pueden establecerse interacciones como la simbiosis o el parasitismo; y factores ambientales abióticos si carecen de vida, como lo son la temperatura, humedad, luz, CO₂ etc. Estos últimos parámetros resultan ser muchas veces las fuentes que determinan circunstancialmente el desarrollo de una planta en un lugar, reconociéndose una óptima concentración o nivel en el cual se desempeñan mejor especies determinadas de plantas. Cuando el rendimiento debido a los niveles altos o bajos en algún parámetro abiótico (condiciones extremas) decae y la capacidad de respuesta y supervivencia de la planta se ve amenazada, se dice que se está en condición de estrés (Salisbury y Ross, 1994; Taiz y Zeiger, 2006).

Puesto que es difícil determinar el desempeño óptimo de un organismo para todos los factores y todas las condiciones a la vez, normalmente se evalúa la variación del factor a estudiar sobre una propiedad clave del organismo, por ejemplo la actividad de una enzima, la fluorescencia de clorofila, la tasa de crecimiento o reproducción, etc. De esta manera los datos obtenidos pueden ser interpretados como un incremento o decremento del estrés respecto a una condición adversa (Salisbury y Ross, 1994).

3. ANTECEDENTES

El medio ambiente influye ya sea positiva o negativamente sobre las posibilidades de supervivencia de un organismo. Cuando la influencia es negativa se dice que se está en estrés (del inglés "stress") "fatiga", que es una condición fisiológica del organismo en la que entran en juego diversos mecanismos de defensa para afrontar una situación que se percibe como amenazante. En ciertas ocasiones los seres vivos poseen capacidades de respuesta que les permiten contrarrestar los efectos del estrés, pero cuando el estrés sobrepasa la capacidad de respuesta, el organismo puede sufrir un gran daño y en muchas ocasiones la muerte (Taiz y Zeiger, 2006).

El estrés puede ser biótico cuando es causado por otro ser vivo (e. g. plagas en los cultivos y herbivoría) o abiótico cuando no es causado por otro ser vivo (e. g. sequía, calor, frío, químicos tóxicos, salinidad, concentración de nutrimentos, salinidad, etc.). Las plantas tienen una gran capacidad de respuesta ante este segundo tipo de estrés (Krebs et al., 2002), mediante la inducción de varios procesos fisiológicos y bioquímicos (Ono et al., 2003). El estrés hídrico es uno de los factores que afectan en mayor medida la distribución de las especies vegetales (Tyree et al. 2003) puesto que el agua es el medio en el cual se llevan a cabo todas las actividades bioquímicas de cualquier forma de vida hasta ahora conocida (Xiong et al., 2002). En las plantas, el agua contenida en el citoplasma celular les provee de la turgencia característica; así también es un medio de transporte de nutrimentos, minerales y hormonas. El déficit de agua desencadena una serie de fenómenos en toda la planta que incluyen cambios morfológicos y fisiológicos, como lo son la disminución del área foliar, el aumento de la biomasa de la raíz, la alteración del metabolismo fotosintético, el cierre de estomas, y con esto la disminución en la capacidad de absorber CO₂, lo que incrementa un segundo tipo de estrés, el oxidativo, etc. (Chaves et al., 2009; Galmés et al., 2007; Schwanz et al., 1996).

La alta salinidad, la sequía y las temperaturas extremas causan estrés osmótico en las plantas, las que a su vez responden por modulación de la expresión génica, que desencadena una serie de mecanismos que restauran eventualmente la homeostasis celular (Xiong y Zhu, 2002).

La tecnología de microhileras empleando ADNc u oligonucleótidos, es una poderosa herramienta para el análisis masivo de los perfiles de expresión génica de plantas expuestas al estrés abiótico como sequía, alta salinidad, frío y respuesta a fitohormonas. Se han detectado algunos genes que se expresan o reprimen frente a las condiciones antes mencionadas (Seki et al., 2001, 2002a y 2002b). Le Provost et al. (2011) analizaron en dos especies de *Quercus* la expresión de un juego de genes que respondían a condiciones de hipoxia. Por otro lado, el estrés hídrico ha sido principalmente analizado en organismos modelo, y poco o se ha hecho en organismos cuya significancia ecológica es mayor, como son los árboles. Una excepción importante es el estudio de transcriptómica comparativa con árboles del género *Populus* en respuesta a sequía Cohen et al. (2010).

Sin embargo, para el género *Quercus*, recientemente mediante mapeo genético se identificaron genes relacionados a la respuesta ante estrés osmótico en una especie de encino blanco europeo, *Quercus petraea* (Porth et al., 2005a). Posteriormente en un segundo trabajo se utilizaron las secuencias de estos genes para comparar los perfiles de expresión en cultivos celulares entre las dos especies de encinos blancos europeos más importantes, *Quercus robur* y *Q. petraea* (Porth et al., 2005b).

Para extrapolar los resultados de los estudios antes mencionados en otras condiciones y especies de encino, el propósito de la presente tesis fue realizar un análisis de la expresión de dichos genes previamente identificados, en plántulas del encino rojo mexicano *Quercus castanea* sometidas a niveles contrastantes de riego. A continuación se realiza una breve revisión sobre el papel molecular y/o fisiológico hasta ahora conocido que juegan los siete genes que intentamos analizar, incluidos los tres cuya expresión analizamos en *Quercus castanea* (todos se resumen en la Tabla 1).

Tabla 1. Genes relacionados a la respuesta ante estrés osmótico en el género *Quercus*.

Gen	Función	Cita
<i>ltp</i> (Proteína Precursora de transferencia de lípidos)	Transporte de lípidos, formación de coberturas cerosas en las hojas.	Hoh et al., 2005
<i>dpbf</i> (Factor de unión 2 al promotor Dc3)	Proteína reguladora de la transcripción.	Kim et al., 1997
<i>badh</i> (Betaína aldehído deshidrogenasa)	Biosíntesis de glicina betaína un compuesto osmoprotector compatible.	Yang et al., 2005
<i>gst</i> (Glutatión S-transferasa)	Detoxificación, protección ante estrés oxidativo.	Dixon et al., 2002
<i>2og-Fe(II)</i> (Oxigenasa dependiente de 2-oxoglutarato y Fe(II))	Síntesis de antocianidinas y otros metabolitos secundarios, desmetilaciones sobre el ADN e histonas	Wilmouth et al., 2002; Loenarz y Schofield., 2008; Welford et al., 2005
<i>thi</i> (Enzima precursora de Tiazol biosintético)	Involucrada en la biosíntesis de tiamina y en la generación de tolerancia ante daños en el DNA mitocondrial	Godoi et al., 2006; Machado et al., 1996 y 1997
<i>hscp80</i> (Proteína cognada de shock térmico 80)	Asistencia en el plegamiento del proteínas (chaperona)	Gupta et al., 2010

3.1 Función de la proteína precursora de transferencia de lípidos (LTP)

3.1.1 Componentes de la cutícula vegetal

Todo el sistema aéreo de una planta superior se encuentra cubierto por una cutícula (del latín piel) (Matzke y Riederer, 1991). La mayor parte de esta cutícula se compone de una mezcla heterogénea de un polímero llamado cutina cuyos monómeros son ácidos grasos que contienen grupos hidroxilos en sus cadenas hidrófobas que se encuentran esterificados, formando así una gran red tridimensional de tipo ceroso. Además de la cutina, en la cutícula se pueden encontrar otro tipo de compuestos que repelen el agua como alcoholes, esteres, aldehídos, y diversos compuestos fenólicos, en su mayoría con cadenas hidrocarbonadas muy largas (Greer

et al., 2007; Post-Beittenmiller, 1996). La suberina también es un biopolímero de recubrimiento, pero es menos evidente que la cutina por el hecho de que se encuentra situada en las partes de la planta que están bajo tierra, en las partes leñosas, y en donde hubo heridas que sanaron. Así, la suberina es similar a la cutina en que posee una fracción poliéster importante, pero se diferencia en que tiene un dominio polifenólico mucho más abundante, y en los tipos de ácidos grasos que presenta (Bernards, 2002).

La síntesis de ceras tales como la cutina y suberina en las plantas son uno de los mecanismos por el cual las plantas se protegen de varios factores ambientales, pues la naturaleza reflectiva de estas ceras ofrece disminución de los daños ocasionados por los rayos UV incidentes (Post-Beittenmiller, 1996), minimiza la adhesión de polvo, polen, esporas y la fusión deletérea de los órganos de la planta (Greer et al., 2007). Además, proveen la primera línea de defensa o interacción con bacterias, hongos e insectos (Gniwotta et al., 2005). En condiciones de sequía, las ceras reducen considerablemente la pérdida no estomatal de agua de sus hojas, flores, frutos y tallos (Cameron et al., 2006. Müller y Riederer., 2005). Sin esta cubierta protectora la transpiración de la mayoría de las plantas terrestres sería tan rápida que podrían morir. Por el contrario se ha visto que en condiciones de alta humedad se suprime la producción de estas ceras haciendo suponer que su papel en la supervivencia de las plantas esta mediado por factores ambientales y de desarrollo (Rhee et al., 1998).

3.1.2 Las proteínas LTP y su rol en la formación de cutícula.

Numerosas enzimas están implicadas en la biosíntesis de las antes mencionadas capas cerosas, como lo son ciertas desaturadas, oxidasas, epoxidasas, elongadas, esteradas, etc. (Kandel et al., 2006, Bernards, 2002) que se encuentran muy activas principalmente en las membranas microsomales de las células epidermales de la planta (Rhee et al., 1998). Sin embargo, se ha propuesto que un tipo de proteínas está involucrado en el transporte de los monómeros grasos desde los organelos donde se realiza su síntesis hasta la periferia de los tejidos subterráneos y aéreos donde se forman los recubrimientos cerosos. Estas entidades moleculares son

llamadas Proteínas de Tránsito de Lípidos (LTPs) y son básicamente de un tamaño aproximado de 7-9 Kd (Hoh et al., 2005). Hay muchas razones por las cuales se les atribuye que tienen esta función:

- Se encuentran principalmente en la pared celular y son secretadas.
- La expresión de los genes *ltp* que codifican a las LTPs, se encuentra asociada principalmente a las células periféricas.
- Las LTPs se pueden encontrar en la superficie cerosa principalmente en hojas jóvenes y flores.
- Son capaces de unirse a ácidos grasos de cadena larga.

Otras hipótesis señalan que además modulan el crecimiento y desarrollo (Nieuwland et al., 2005), poseen actividades antibióticas por lo que actúan manteniendo la integridad celular contra patógenos bacteriales y fungales (Yeats y Rose, 2008), facilitan el tráfico intracelular de lípidos y se ha demostrado que la expresión diferencial de genes *ltp* es regulada por ciertos factores ambientales como el frío y el estrés osmótico (Kader 1996).

3.2 Función del factor de unión 2 al promotor Dc3 (DPBF)

3.2.1 Embriogénesis de semillas

La embriogénesis es un proceso que comienza con una sola célula y resulta en la formación de un embrión maduro el cual puede desarrollarse posteriormente en una planta con multicelularidad, sexualidad y estructura (Mayer et al., 1991). Mientras ocurre la maduración muchos procesos únicos de esta fase se llevan a cabo, como lo son; la síntesis y acumulación de nutrientes de reserva, la supresión de una germinación prematura y la adquisición de tolerancia a la desecación (Goldberg et al., 1994). Algunos genes llamados *lea* (late embryogenesis abundant) son inducidos en esta etapa, es decir incrementan su expresión durante estadios de desarrollo embrionario (Chung et al., 2005). La función de estos genes es aún poco conocida, pero en tejidos no embrionarios los productos de tales genes son ubicuos en las plantas superiores, involucrándose al igual que en el caso de los embriones, en

procesos como la deshidratación (induciéndose incluso en presencia del ácido abscísico exógeno), y estrés ambiental como sequía y salinidad (Kim et al., 2002). Se han propuesto varios mecanismos por el cual tales proteínas logran este fin: la retención de agua por ligación a residuos hidrófobos, secuestro de iones, protección directa de otras proteínas y membranas, renaturalización de proteínas (Wise., 2003), y más recientemente su actividad como chaperonas moleculares (Goyal et al., 2005).

3.2.2 Factor de unión 2 al promotor Dc3 (DPBF2)

Los factores de transcripción (TF) juegan un papel crucial en la regulación de infinidad de procesos biológicos. Estructuralmente, los TFs son usualmente clasificados por sus dominios de unión al ADN (Jakoby et al., 2002). Recientemente se identificó una nueva y pequeña familia de factores de transcripción que contienen un motivo llamado región básica-cierre de leucina (bZIP) que se unen a la secuencia promotora de una clase de genes *lea* llamados *Dc3* (Dc proviene del nombre científico de la zanahoria *Daucus carota*). Los factores de transcripción antes mencionados son referidos como Factores de unión al promotor Dc3 (DPBFs del inglés "Dc3 promoter-binding factors").

No se conoce exactamente la naturaleza regulatoria de los DPBF, ni tampoco cual es el impacto a nivel fisiológico, estructural o celular de la expresión de los genes *Dc3*, pues como se mencionó antes, solo se sabe que estos incrementan su expresión durante la embriogénesis somática y zigótica (quizá previniendo algún daño en esta fase crucial del desarrollo), así como también en tejidos no embrionarios en respuesta a diversas condiciones de estrés (Kim et al., 1997).

3.3 Función de la proteína betaína aldehído deshidrogenasa (BADH)

La capacidad del agua de moverse espontáneamente en un sistema particular depende de su energía libre. La magnitud más empleada para medir la energía libre del agua es el potencial hídrico (Ψ_h). En general el agua se mueve desde regiones donde el potencial hídrico es mayor a otras donde es menor.

El potencial hídrico es determinado básicamente por cuatro factores: el potencial gravitatorio (Ψ_g), de presión (Ψ_p), mátrico (Ψ_m) y osmótico (Ψ_o). Así, el potencial hídrico total está dado por la contribución independiente (ya sea positiva o negativa) de los cuatro potenciales antes mencionados (ver ecuación 1) siendo el potencial osmótico al que nos enfocaremos con más detalle por estar mejor relacionado con este trabajo.

$$\Psi_h = \Psi_o + \Psi_m + \Psi_g + \Psi_p$$

Ecuación 1: Determinantes del potencial hídrico

El potencial osmótico representa el componente determinado por la presencia de solutos disueltos en el agua, es decir, si la concentración de solutos aumenta el potencial osmótico disminuye. Por lo tanto, sin la presencia de otros factores que alteren el potencial hídrico, las moléculas de agua de las disoluciones se moverán desde lugares con poca concentración de solutos a lugares con mayor concentración de soluto. El Ψ_o se considera cero para el agua pura. De aquí que el control de tal proceso fisicoquímico por parte de las plantas sean uno de los mecanismos que contrarresten la pérdida de agua favoreciendo su acumulación en los tejidos vegetales (Salisbury y Ross, 1994).

3.3.1 Protección osmótica contra la pérdida de agua

La salinidad en el suelo y la cantidad de agua en este mismo, son los mayores factores limitantes en la distribución geográfica de las plantas (Kumar et al., 2004). En respuesta a tal estrés abiótico estos organismos utilizan ciertos mecanismos de protección que mantienen el metabolismo celular y previenen el daño de algunos de sus componentes. Una de estas adaptaciones metabólicas es la acumulación de compuestos osmoprotectores compatibles, es decir, compuestos orgánicos solubles en agua (azúcares, alcoholes, aminoácidos, sales cuaternarias de amonio, compuestos ternarios de sulfonio) de bajo peso molecular que no son tóxicos o que permiten a las enzimas y proteínas funcionar correctamente en altas concentraciones

de tales solutos (Rathinasabapathi, 2000). Las cantidades de estos osmolitos ayudan a mantener la turgencia de las células y la rigidez de las hojas (Wood et al., 1996). Muchas plantas, como también otros organismos, acumulan este tipo de compuestos orgánicos tales como la Glicina betaína (N,N,N-trimetilglicina, también llamada simplemente betaína) en condiciones de estrés salino, sequía y bajas temperaturas (Yang et al., 2005). En las plantas, la síntesis de glicina betaína es catalizada principalmente por dos enzimas, la primera enzima (Colina monooxygenada, CMO) oxida la colina a betaína aldehído. Posteriormente, tal metabolito es transformado en un último paso a glicina betaína por la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) (Rathinasabapathi, 2000). BADH se encuentra en una proporción del 90% en los estromas de los cloroplastos y el remanente en el citosol. La actividad BADH se incrementa en condiciones de estrés salino (Weretilnyk et al., 1990).

3.4 Función de la proteína glutatión S-transferasa (GST)

La paradoja de la vida aeróbica o la "paradoja del oxígeno", es que los organismos eucariotas superiores no pueden existir sin oxígeno aunque sea intrínsecamente peligroso para su existencia (Davies, 1995). El "lado oscuro" del oxígeno radica en que mientras se llevan a cabo los procesos metabólicos normales para la obtención de energía (fotosíntesis, respiración, foto-respiración) se generan subproductos potencialmente nocivos. Por ejemplo, la reducción del oxígeno molecular por un electrón genera el radical anión superóxido. Si se adiciona otro electrón y dos protones se genera peróxido de hidrógeno, y una tercera adición de otro electrón genera el radical hidroxilo (Mittler., 2002). Los elevados niveles de estas moléculas, llamadas "especies reactivas de oxígeno" (ROS por sus siglas en inglés), y las incontables modificaciones oxidativas causadas por su reacción con las macromoléculas pueden resultar contraproducentes llevando a un detrimento de las funciones celulares y finalmente la muerte celular (Minibayeva et al., 2012). Otras condiciones en las que se favorece la formación de ROS son la exposición a intensidades de luz y calor altos, exposición a metales pesados, radiación UV, contaminación, estrés salino, sequía y ataques de patógenos (Dat et al., 2000). Aún así, las

plantas y otros organismos mantienen una amplia serie de mecanismos para combatir estos problemas. Los antioxidantes terminan estas reacciones interviniendo en su formación o inhibiendo otras reacciones de oxidación dañina oxidándose ellos mismos (Kohen y Nyska., 2002). Por otro lado, existe la regulación redox, la cual ha sido demostrada en procesos diversos como la regulación de la expresión génica en condiciones de estrés, transducción de señales, cierre estomático, resistencia a enfermedades, señalización hormonal, desarrollo vegetativo y de órganos reproductivos así como en el control de arquitectura vegetal (Apel y Hirt, 2004; Foyer y Noctor, 2005). Pero cuando una célula es incapaz de mantener la homeostasis celular por medio de la regulación redox, causando un desbalance exacerbado en el estado celular redox normal en favor de los procesos oxidantes, se dice que está en estrés oxidativo (Bartosz, 1997; Potters et al., 2010).

3.4.1. Mecanismos de protección contra el estrés oxidativo: El glutatión

Para sobrevivir al estrés oxidativo, las plantas han desarrollado múltiples sistemas de defensa incluyendo la prevención de una excesiva formación de ROS, controlando las enzimas productoras de ROS y la activación de una compleja defensa con enzimas antioxidativas (superóxido dismutasa "SOD", catalasa y peroxidasas), de detoxificación de la peroxidación lipídica (glutatión s-transferasas, fosfolípido-hidroperóxido glutatión transferasas y ascorbato peroxidasas) y antioxidantes de bajo peso molecular (ascorbato, glutatión, tocoferoles y compuestos fenólicos) (Blokina et al., 2003; Minibayeva et al., 2012).

Existen "tres grandes" antioxidantes por su presencia en grandes cantidades: el ácido ascórbico, el glutatión y nucleótidos NAD(P)H, ordenados de mayor a menor respecto a su cuantía en tejidos vegetales (Potters et al., 2010). El glutatión es un tripéptido con la secuencia γ -L-glutamil-L-cisteinil-glicina conteniendo un enlace peptídico inusual entre el grupo amino de la cisteína y el grupo carboxilo de la cadena lateral del glutamato. El glutatión existe en su forma reducida u oxidada como un dímero unido por un puente disulfuro e implica la pérdida de dos electrones y dos protones (Noctor y Foyer, 1998). Juega roles adicionales en un amplio rango de organismos,

como lo son la detoxificación xenobiótica, por ejemplo de metales, e incluso está involucrado en la señalización celular. Su rol principal en la defensa antioxidativa es debido a su habilidad para regenerar otro poderoso antioxidante, el ácido ascórbico, por la vía del ciclo glutatión-ascorbato (Blokhina et al., 2003).

3.4.2. Glutatión S-transferasa como promotor de detoxificación

Las enzimas glutatión S-transferasas (GST) son proteínas solubles con un peso molecular típico de 50 KDa, cada una compuesta de dos subunidades polipeptídicas, que son codificadas por una grande y diversa familia de genes en las plantas, las cuales han sido clasificadas con base en la identidad de las secuencias en ϕ , τ , θ , ζ y λ (Öztetik, 2008). Estas catalizan la conjugación del grupo tiol del glutatión (GSH) a diversos centros electrofílicos o moléculas lipofílicas con la formación de productos finales con tasas de actividad menores (Dixon et al., 2002). Las GST son expresadas predominantemente en el citosol y se le han atribuido una gran cantidad de actividades, las cuales incluyen la detoxificación de herbicidas, y la reducción de hidroperóxidos orgánicos formados durante el estrés oxidativo (Marrs et al., 1996). Haciendo énfasis en su participación frente a la tolerancia en el estrés oxidativo también se han propuesto roles como potencial regulador de la apoptosis, puesto que la suprime cuando es inducida por la proteína BAX, aparentemente por prevención del daño oxidativo (Kampranis et al., 2000).

3.5. Multifuncionalidad de la familia de proteínas Oxigenasa 2OG-Fe(II)

Las enzimas oxigenasas dependientes de hierro y 2-oxoglutarato son una superfamilia de enzimas que contienen hierro no hemo, las cuales tienen una amplia serie de funciones. Sin embargo, todas desarrollan un mecanismo de catálisis común en el cual la oxidación del sustrato primario es acoplado a la descomposición del co-sustrato 2-oxoglutarato en succinato y CO_2 (Luo, 2006). Resulta difícil establecer el vínculo más probable de la repercusión fisiológica, estructural o molecular que tiene la expresión de la familia de enzimas en respuesta al estrés hídrico, por la variedad de funciones que desempeñan como son: la síntesis de antocianidinas (Wilmouth et

al., 2002), las cuales pertenecen al grupo de moléculas llamadas flavonoides que dan el color rojo, azul o púrpura a los tejidos vegetales. Estas moléculas proveen protección ante daños foto-oxidativos por rayos UV, y por otra parte, proveen resistencia a metales y control del transporte de auxinas, estas últimas involucradas en la regulación de la apertura estomática (Winkel-Shirley, 2002). Un contraste en las funciones de esta familia es marcado por la actividad desmetilante sobre el ADN e histonas, lo cual hace pensar que funcionan como enzimas reparadoras del ADN y reguladoras de la expresión génica (Yi et al., 2010; Loenarz y Schofield, 2011). Esto abre una veta para la investigación en el entendimiento del rol de estas oxigenasas en la regulación epigenética (Loenarz y Schofield., 2008). En las plantas, otras funciones incluyen desaturaciones, ciclaciones oxidativas, halogenaciones, estas reacciones de oxidación "exóticas" son comunes en metabolitos secundarios (Welford et al., 2005; McDonough et al., 2010).

3.6 Función de la enzima precursora de Tiazol biosintético (THI)

El mantenimiento de la integridad del genoma es esencial, ya que así se asegura que la información contenida en el ADN se replique de manera fiel. En todos los organismos vivos existen mecanismos para proteger el material genético de daños por agentes ambientales o por productos propios del metabolismo, estos mecanismos pueden ser por reparación del ADN o tolerancia ante daños (Machado et al., 1996). Existen muchas formas en las que un organismo puede ser dañado, por ejemplo por especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species: ROS) las cuales pueden oxidar muchos tipos de macromoléculas importantes que después de la oxidación producen una amplia serie de modificaciones genotóxicas, como bases y residuos de azúcar alterados en el ADN (Roldán-Arjona y Ariza, 2009), que a la vez provocan el rompimiento de una o ambas hebras de este último; pudiendo traer serias consecuencias al organismo en cuestión si el daño no es reparado adecuada y oportunamente (Waterworth et al., 2011). Otros tipos de daños están relacionados con la exposición a longitudes de onda de alta frecuencia como los rayos UV, mutágenos químicos orgánicos e inorgánicos, o simplemente errores de replicación

causando otro tipo de aberraciones como pérdida o desacoplamiento de bases, pirimidinas enlazadas, etc. (Tuteja et al., 2001).

Puesto que en las mitocondrias se realiza la fosforilación oxidativa y se encuentra entre el 1 y 10% del ADN celular, también se ha encontrado que existe una mayor tasa de daño oxidativo en el ADN mitocondrial (ADNmt), probablemente por la vasta generación de ROS en este organelo. De la misma manera que el ADN nuclear, el ADNmt requiere de mantenimiento por la maquinaria celular para mantener su estabilidad y así evitar daños fatales provocados por mutaciones en los genes codificantes de proteínas responsables de los procesos respiratorios (Bohr y Dianov, 1999).

3.6.1 La proteína THI y su rol dual de protección en daños en el ADN mitocondrial

La vitamina B1 también conocida como tiamina es una molécula orgánica conformada por dos estructuras heterocíclicas (un anillo pirimidina y un anillo tiazol) unidos mediante un enlace metileno. La forma biológicamente activa es el pirofosfato de tiamina o difosfato de tiamina. El pirofosfato de tiamina funge como cofactor en varias enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos y de aminoácidos de cadena ramificada y es sintetizado por arqueas, bacterias, hongos y plantas, a diferencia de todo el reino animal, que tiene que obtenerlo de la dieta. La biosíntesis de tiamina ocurre por la condensación de dos intermediarios precursores comúnmente llamados fragmentos pirimidina y fragmento tiazol. En las bacterias 6 genes están involucrados en la síntesis del fragmento tiazol y dos genes en la síntesis del fragmento pirimidina y un gen más en la condensación de ambos fragmentos a la forma fosfato de tiamina. En *Saccharomyces cerevisiae* solo se ha identificado una enzima para la biosíntesis del fragmento pirimidina (THI5) y otra para el fragmento tiazol (THI4) (Jurgenson et al., 2009).

La proteína THI4 es encontrada como ortólogo en plantas y arqueas. En *Arabidopsis thaliana*, el ortólogo fue llamado THI1 por ser la primera proteína de esta vía metabólica descubierta en plantas (Godoi et al., 2006). Sin embargo, estudios en

estas proteínas han arrojado evidencia para deducir que además de su rol en la biosíntesis de tiazol estas juegan un papel protector de la estabilidad generando tolerancia a daños al ADNmt (Machado et al., 1996 y 1997).

3.7 Función de las proteínas de shock térmico (HSP)

La homeostasis celular está determinada en parte por la capacidad de la célula para mantener la estructura tridimensional de sus proteínas y por lo tanto su funcionalidad; tal capacidad es mantenida por un conjunto de sistemas regulatorios que controlan la síntesis y degradación de proteínas. Sin embargo otro mecanismo son las chaperonas moleculares las cuales juegan un papel importante en la homeostasis proteica ayudando a otras proteínas a plegarse correctamente y previniendo que las proteínas mal plegadas se aglutinen causando devastadoras consecuencias (Nicchitta, 2009).

Cuando un organismo se encuentra en estrés por calor generalmente se producen cambios celulares no favorables a la supervivencia, especialmente sobre funciones básicas. Por ejemplo, en ciertas plantas arriba de 30 °C se deprime el aparato fotosintético y después de 35 °C se desacelera la respiración. También a altas temperaturas se desorganiza el movimiento de agua y solutos a través de las membranas celulares, se reducen la solubilidad de los gases, la absorción de agua y minerales, se generan especies químicas tóxicas, así como el desencadenamiento de otros tipos de estrés como el osmótico y oxidativo (Efeoglu, 2009). A nivel molecular se afecta la constante de Michaelis-Menten (k_m) de la enzimas desencadenando un desajuste de los procesos metabólicos así como la inactivación y desnaturalización de otras proteínas ya que su actividad depende en gran medida de la estructura ternaria, la cual se ve comprometida en temperaturas altas (Al-Whaibi, 2011) debido a la ruptura de los puentes de hidrógenos intramoleculares.

3.7.1 Las proteínas de shock térmico como chaperonas moleculares

Las proteínas de shock térmico se describieron por primera vez en 1962 en ensayos celulares en *Drosophila melanogaster*, después de que estas se expusieron a estrés por calor. Actualmente se han descrito varios tipos de proteínas de shock térmico en células procariotas y eucariotas agrupándose en cinco principales familias de acuerdo a su peso molecular, homologías entre las secuencias y funciones; estas son la familia Hsp100, Hsp90, Hsp70, Hsp60 y sHsp (small Heat shock proteins) (Gupta et al., 2010). Estas proteínas se encuentran en diversos organelos como el núcleo, mitocondrias, cloroplastos y retículo endoplasmático, y son consideradas chaperonas de otras proteínas uniéndose no covalentemente a sus blancos hasta que alcanzan sus conformaciones competentes pero sin formar parte del producto final (Wang et al., 2004). Se ha demostrado su expresión no solo en condiciones de temperaturas adversas si no también en condiciones normales, frente a ambientes tóxicos, salinos, secos, etc. Es por esto que las proteínas de shock térmico juegan un papel importante tolerando los efectos devastadores del estrés ambiental manteniendo la homeostasis celular (Wang et al., 2003).

3.7.2 La proteína cognada de shock térmico 80 (HScP80)

Los miembros la familia HSP90 han sido estudiados específicamente, entre ellos, la proteína de shock térmico 80 (HSP80), cuyas funciones e interacciones se encuentran fundamentados en datos encontrados en varios organismos eucariotas. Sin embargo, se han descrito algunos ADNc con homologías considerables a las HSP80 llamándolas proteínas cognadas de shock térmico (HScP80). Es así, que lo poco que es sabido sobre estas radica en el hecho de que además de que se expresan en condiciones de estrés por calor lo hacen de manera elevada en tejidos con células jóvenes, mientras que en tejidos maduros tienen una expresión mucho menor (Koning et al., 1992).

3.8 El cambio climático global y sus efectos

El clima permanece en constante cambio, existen muchos factores que favorecen tales fluctuaciones como son la radiación solar, latitud, altitud, el relieve, movimientos orbitales y de rotación de la tierra, la actividad volcánica, corrientes marinas y atmosféricas, ciclos de Milankovitch, etc. Sin embargo, a lo largo de miles de años han existido fenómenos climatológicos que por su magnitud han reconfigurado de forma importante las formas de vida alrededor del globo, por ejemplo cambios rápidos por calentamiento, rápido enfriamiento global o fluctuaciones rápidas de calentamiento y enfriamiento estando esto correlacionado con la pérdida de diversidad de especies (Twitchett, 2006).

La capacidad de las especies a responder a un cambio climático dependerá en gran manera de su habilidad de "seguir" el cambio del clima colonizando nuevos territorios, modificando su fisiología o su conducta estacional (como el periodo de florecimiento o apareamiento) (Thuiller, 2007). Si hablamos de adaptación en poblaciones aisladas, la respuesta al cambio climático dependerá de los niveles de variabilidad genética dentro de las poblaciones. Si la población contiene una considerable variabilidad de rasgos que determinan la respuesta al clima es probable que muestre una mayor adaptabilidad a los cambios que las que son genéticamente menos variables (Jump y Peñuelas, 2005).

Se tiene conocimiento de cambios abruptos del clima en toda la historia de la tierra causado por varios factores (todos naturales), sin embargo la influencia del hombre sobre los ecosistemas ha desencadenado una serie de cuestiones que apuntan a las acciones humanas como la causa de los grandes problemas ambientales actuales (Alley et al., 2003). Un ejemplo de sus efectos a gran escala es el daño en la capa ozono (Newman et al., 2006).

Para el Panel Intergubernamental del Cambio Climático (por su siglas en inglés IPCC), el término "cambio climático" denota un cambio en el estado del clima identificable (por ejemplo, mediante análisis estadísticos) a raíz de un cambio en el valor medio y/o en la variabilidad de sus propiedades, y que persiste durante un período prolongado, generalmente cifrado en decenios o en períodos más largos. Denota todo

cambio del clima a lo largo del tiempo, tanto si es debido a la variabilidad natural como si es consecuencia de la actividad humana. Este significado difiere del utilizado en la Convención Marco de las Naciones Unidas sobre el Cambio Climático (CMCC), que describe el cambio climático como un cambio del clima atribuido directa o indirectamente a la actividad humana, que altera la composición de la atmósfera mundial y que viene a sumarse a la variabilidad climática natural observada en períodos de tiempo comparables. Es también llamado Cambio Climático Antropogénico.

De acuerdo con Mawdsley et al., (2009), el cambio climático ya tiene algunos efectos descritos en ciertas especies y ecosistemas, a la fecha algunos son:

- Cambios en la distribución de especies a menudo a lo largo de gradientes elevacionales.
- Cambios en la fecha de eventos en la historia de vida o fenología, para especies particulares.
- Desacoplamiento de interacciones coevolutivas, como relaciones planta polinizador.
- Efectos en tasas demográficas como supervivencia y fecundidad.
- Reducción del tamaño poblacional (especialmente para especies boreales y de montaña).
- Extinción o extirpación de especies o poblaciones aisladas o con rango restringido.
- Pérdida directa de hábitat debido a la elevación del nivel del mar e incremento en la frecuencia de incendios, brotes de escarabajos descortezadores, alteraciones de los patrones del tiempo, recesión de glaciares y calentamiento directo de hábitats.
- Incremento de enfermedades silvestres, parásitos y zoonosis.
- Incremento de poblaciones de especies que son competidores directos de especies enfocadas a esfuerzos de conservación.

- Incremento de la propagación de especies invasivas o no nativas, incluyendo plantas, animales y patógenos.

La comunidad científica internacional acepta en general que *"Las actividades humanas... están modificando la concentración de los constituyentes atmosféricos... que absorben o dispersan energía radiante. ... Mucho de calentamiento global observado en los últimos 50 años es probable que haya sido debido al incremento de la concentración de los gases de invernadero"* (Oreskes, 2004). Por ello se han propuesto y establecido varios organismos (como el IPCC) que pretenden junto con los gobiernos y científicos establecer acciones para lograr la estabilización de las concentraciones de gases de efecto invernadero en la atmósfera a un nivel que impida interferencias antropógenas peligrosas en el sistema climático; así como acciones de adaptación las cuales en el contexto del plano del cambio climático son actividades humanas que intentan minimizar los efectos adversos de este sobre la infraestructura humana y el ambiente natural (Mawdsley et al., 2009). Entre ellas están algunas como el incremento, restauración y diseño de áreas protegidas para facilitar la resiliencia, protección de corredores de movimiento, piedras de parada y refugios, conservación de recursos para las especies que pueden volverse extintas, evaluar y mejorar los programas de vida silvestre y ecosistemas así como el establecimiento de leyes y políticas para la conservación de la biodiversidad, entre otras (Mawdsley et al., 2009).

Los modelos climáticos sugieren que el calentamiento global podría traer condiciones más cálidas y secas a México. Aunque se proyectan aumentos de precipitación en algunos modelos, en la mayoría de los casos, no compensan el aumento de la evaporación potencial. Por lo tanto, la disponibilidad de la humedad del suelo y el agua puede disminuir en gran parte de México, con graves consecuencias para las plantas en general, incluyendo la agricultura de riego y de no riego, abastecimiento de agua urbana e industrial, la energía hidroeléctrica y de los ecosistemas (Liverman y O'Brien, 1991). De acuerdo con modelos de evaluación de la vulnerabilidad para México realizados por Villers-Ruiz y Trejo-Vázquez (1997), más de la mitad del país

(entre 50 y 57%) cambiaría sus condiciones de temperatura y precipitación. Al parecer, en algunos de los escenarios proyectados por estos modelos existirá un aumento de la temperatura y disminución de precipitaciones que favorecería el establecimiento de comunidades tropicales, restando terreno a bosques templados de encino y de coníferas establecidos en climas templados y semifríos; estos últimos desaparecerían, en otros escenarios menos severos los bosques de coníferas asentados en climas semifríos, serían remplazados por comunidades más templadas, por ejemplo encinares, que a su vez, tenderían a establecerse en lugares con mayor altitud. Por lo anterior, es importante conocer los mecanismos de resistencia ante la reducción y estrés hídrico en especies de encinos, ante la posible desaparición de muchas de sus poblaciones.

Quercus castanea Née es conocido comúnmente como capulincillo, encino amarillo, encino blanco, encino colorado, encino chino, encino negro, encino prieto, encino rojo, encino rosillo, palo colorado, roble, urikua y urik urapiti. Tiene proporciones de 5 a 20 m de altura y con un diámetro del tronco de 30 a 60 cm, con corteza café oscura, hojas oblanceolada, oblonga, lanceolada y obovada de 2.5 a 15 cm de largo por 1.3 a 5 cm de ancho; haz verde grisáceo, algo lustroso y rugoso; envés gris a amarillento con escaso tomento. Con fructificaciones anuales, en grupos de 2 ó 3; bellota ovoide y de 18 a 25 mm de largo por 12 mm de diámetro. Se usa como leña, carbón, cercas, horcones, cabos, arados, ejes de carreta, trompos, baleros, muebles, medicinal y extracción de celulosa para papel. Se propagan por bellotas producidas de noviembre a enero. Habita en laderas y cañadas, en bosque de pino-encino y bosque mesófilo entre 1400 a 2600 metros sobre el nivel del mar y sobre suelos arcillosos o arenosos con pedregosidad, distribuyéndose desde México (Chiapas, Colima, Distrito federal, Durango, Guerrero, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, México, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tlaxcala y Veracruz) hasta Centroamérica. Actualmente no existen programas de manejo para su aprovechamiento (Arizaga et al., 2009).

4. JUSTIFICACIÓN

Los bosques de encino ocupan una gran proporción de la totalidad del territorio mexicano (Rzedowki, 1991), además de que tienen una gran importancia ecológica y económica (Valencia, 2004), por lo que la preservación del género *Quercus* es de vital importancia en México. En este sentido, es de interés conocer los mecanismos a través de los cuales estos árboles son capaces de tolerar diversos tipos de estrés, incluyendo el estrés hídrico.

5. HIPÓTESIS

La respuesta de *Quercus castanea* (Fagaceae) a estrés hídrico involucra cambios en los niveles de expresión de genes y cambios fisiológicos relacionados a esta respuesta, similares a los previamente caracterizados en otros modelos de estudio en plantas.

6. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos del estrés hídrico en *Quercus castanea* (Fagaceae) a nivel molecular y fisiológico.

6.1. Objetivos Específicos

Analizar la expresión genética de los genes *ltp*, *dbpf2*, *badh*, *gst*, oxigenasa 2OG-Fe(II), *thi* y *hsp80*, en plántulas de *Quercus castanea* sometidas a estrés hídrico.

Analizar los cambios en tasa fotosintética, conductancia estomática y transpiración, en plántulas de *Quercus castanea* sometidas a estrés hídrico.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material biológico

Se realizaron dos ensayos en dos lotes de plántulas de *Quercus castanea*. Las plántulas fueron mantenidas en una casa sombra y los análisis fisiológicos se realizaron mediante un equipo IRGA (Infra-red gas analyzer) LI-COR Modelo LI-6400 XT.

7.1.1. Tratamiento para obtención de datos fisiológicos y colecta de muestras biológicas foliares

A plantas de 26 macetas con un número variable de individuos (6 a 9) de *Q. castanea* de aproximadamente 3 años de edad y 20 centímetros de altura se les midieron tres condiciones fisiológicas (fotosíntesis, conductancia estomática e intercambio gaseoso). A las plantas de 19 macetas se les trató mediante privación total de agua durante 21 días (tiempo que tardaron estas plántulas en fenecer) mientras que a las 7 macetas restantes no se les limitó el agua, regándose constantemente. Un día antes, previo a la toma de datos fisiológicos inicial (Día 0) todas las macetas fueron regadas con agua para homogenizar las condiciones fisiológicas iniciales entre ambos tratamientos.

Los datos fisiológicos se obtuvieron los días 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10, 13, 14, 15 y 21 de 10 individuos diferentes (5 correspondientes al grupo tratamiento y 5 al grupo control) de 10 diferentes macetas (5 correspondientes al grupo tratamiento y 5 al grupo control) seleccionadas al azar. Inmediatamente después de haber obtenido los datos fisiológicos, de estos mismos 10 individuos se tomaron 6 muestras de tejido (3 hojas correspondientes al grupo tratamiento y 3 hojas correspondientes al grupo control) para los análisis de expresión, las cuales se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenaron a -70 °C hasta su debido procesamiento.

7.1.2. Tratamiento para obtención de datos fisiológicos y colecta de muestras biológicas radiculares

A 24 macetas de *Q. castanea* de aproximadamente 3 años de edad y 20 centímetros de altura se les midieron tres condiciones fisiológicas (fotosíntesis, conductancia estomática e intercambio gaseoso). A 12 de las macetas se les trató mediante privación de agua durante 13 días (tiempo que tardaron estas plántulas en fenecer) mientras que al resto no se les limitó el agua. Un día antes, previo a la toma inicial de datos fisiológicos todas las macetas fueron regadas con agua para homogenizar las condiciones fisiológicas entre ambos tratamientos.

Los datos fisiológicos se obtuvieron los días 1, 2, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 13; de 4 diferentes individuos (2 correspondientes al grupo tratamiento y 2 al grupo control) de 4 diferentes macetas (2 correspondientes al grupo tratamiento y 2 al grupo control) seleccionadas al azar. Inmediatamente después de haber obtenido los datos fisiológicos, de estos mismos individuos se tomaron las 4 muestras de tejido (toda la raíz de cada plántula) para análisis de expresión. Las muestras se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70 °C hasta su debido procesamiento.

7.2. Extracción de ADN genómico

Para extraer el ADN genómico se utilizó una versión modificada en nuestro laboratorio de la técnica establecida por Dellaporta et al. (1983). Se pulverizaron aproximadamente 0.1 gramos de tejido con nitrógeno líquido en un mortero, se añadieron 160 µL de solución CTAB (Bromuro de cetiltrimetilamonio) y se homogeneizó. A continuación se añadieron 600 µL de la solución de la Porta (20 mL Tris 1 M pH 8; 30 mL EDTA 0.5 M pH 8; 1 mL NaCl 5 M; 259 mL H₂O) y se homogeneizó. Se transfirió la mezcla del mortero a un microtubo de 1.5 mL, se agregaron 100 µL de solución SDS al 20 % y se agitó en vórtex durante 1 min. Se incubó la muestra a 65 °C durante 7 minutos, se agitó de nuevo en vórtex 15 seg y se incubó a 65 °C durante 5 min. A continuación se agregaron 180 µL de la solución de acetato de potasio 5 M fría (-20 °C) y se agitó suavemente por inversión 3 veces.

Se refrigeró 5 minutos a -20 °C, se centrifugó 20 minutos a 13 000 rpm en una centrífuga Eppendorf y se transfirió el sobrenadante (aproximadamente 600 µL) a microtubos de 1.5 mL limpios. Se añadieron 600 µL de isopropanol frío (-20 °C) y se agitó suavemente por inversión 4 veces. Se centrifugó por 20 min a 13 000 rpm. Se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 mL de etanol a 90 % agitando en vórtex, y luego se centrifugó por 10 min a 13 000 rpm. Se desechó el sobrenadante y la pastilla se secó por 15 min a 30°C en un concentrado centrífugo (centrivap). Finalmente la pastilla se resuspendió en 100 µL de agua destilada estéril y se almacenó a 4 °C para su uso posterior.

7.3. Extracción de ARN total

Para la extracción de ARN total se utilizó un kit comercial QIAGEN (RNeasy Plant Mini Kit for purification of total RNA from plants and filamentous fungi). Se pulverizaron 100 mg de hoja en un mortero con nitrógeno líquido y se agregaron 450 µL de buffer RLC. Posteriormente se adicionaron 160 µL de solución CTAB. Si la mezcla resultante era muy espesa se agregó una cantidad adicional de 50 a 100 µL de solución RLC para disminuir la viscosidad. Se transfirió el lisado a un microtubo de 1.5 mL y se agitó en vórtex 1 minuto. Posteriormente, dicho lisado se transfirió a una columna QIAshredder (color lila) localizada en un tubo de recolección y se centrifugó por 2 min a 13 000 rpm (15 871 rcf). Cuidadosamente se transfirió el sobrenadante del filtrado a un nuevo tubo sin tocar la pastilla formada por los remanentes celulares en el tubo de recolección. (Se usó el sobrenadante en los pasos subsecuentes). Se adicionó 0.5 del volumen de etanol (96-100%) para limpiar el lisado, y se mezcló inmediatamente por pipeteo; luego se transfirió la muestra (usualmente 650 µL), incluyendo cualquier precipitado que pudo haberse formado, a la columna RNeasy (rosa) localizada en un tubo de colección y se centrifugó por 30 seg a 11 000 rpm (11 363 rcf) desechándose el filtrado. Se adicionaron 700 µL de buffer RW1 a la columna RNeasy y se centrifugó 30 seg a 11 000 rpm (11 363 rcf) para lavar la membrana de la columna y se descartó el filtrado. Luego se adicionaron 500 µL de buffer RPE a la columna RNeasy y se centrifugó por 30 seg a 11 000 rpm (11 363 rcf) para lavar la

membrana de la columna, se desechó el filtrado. De nuevo se adicionaron 500 μL de buffer RPE a la columna RNeasy y se centrifugó por 2 min a 11 000 rpm (11 363 rcf), posteriormente se colocó la columna RNeasy en un tubo de colección de 2 mL nuevo y se descartó el tubo de colección antiguo junto con el filtrado y se centrifugó a 13 000 rpm (15 871 rcf) por 1.5 min. Se colocó la columna RNeasy en un tubo de colección de 1.5 mL y se adicionaron 30 μL de agua libre de RNasas directamente a la membrana de la columna y se centrifugó por 1 min a 11 000 rpm (11 363 rcf) para eluir el RNA, se repitió el paso anterior usando otros 30 μL de agua libre de RNasas. Se conservó el RNA a una temperatura de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.4. Amplificación de fragmentos de los genes de interés

Una vez obtenido el ADN genómico se amplificaron fragmentos de los genes de interés por PCR utilizando juegos de oligonucleótidos reportados previamente en la literatura (Porth et al., 2005a, 2005b) (Tabla 2). Cada mezcla de reacción se preparó en microtubos de 0.2 μL en un volumen total de 15 μL como sigue: 7.5 μL de H_2O , 3 μL de Master Stock (275 μL H_2O , 500 μL Buffer 10X, 25 μL MgCl_2 500 Mm, 50 μL dATP 100 μM , 50 μL dCTP 100 μM , 50 μL dGTP 100 μM , 50 μL dTTP 100 μM), 1 μL BSA, 0.5 μL (sin diluir) ADN genómico, o ADNc, 0.5 μL de cada primer (50 μM) y 2 μL de *Taq* polimerasa. La amplificación se realizó como sigue: desnaturalización a 95°C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, alineación a $40\text{-}60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (dependiendo del par de primers) por 1:30 min y polimerización a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 1:30 min, y una extensión final a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 10 min (Eppendorf Mastercycler ep Gradient).

Tabla 2. Pares de oligonucleótidos usados para amplificar fragmentos de los ocho genes bajo estudio (Porth et al., 2005a, 2005b).

Gen	EST	Secuencia Oligo Forward (5'>3')	Secuencia Oligo Reverse (5'>3')	Tamaño pb
<i>ltp</i>	1T9 (+)	AGA TCA GCA CCT CCA CCA AC	GCC GAG GTA CAT GAG GAA ATA C	484
	1T9 (-)	CCG GTA GCA TCT CTG GAC TTA	ACC TCT CAC TTC ACG TTT TTG CA	~100
<i>dpbf</i>	1T57 (+)	TGG TTT GCT TCA GCC TAC AAT GTG ATG	TGA GCA TTT TGA ATA CGT GTG TTA TAC T	282
	1T57 (-)	GGT GGA TGT AAG CAA AGC TGT CT	AAC ATC ACA TTG TAG GCT GAA GCA	~100
<i>badh</i>	1T62 (+)	AGG CTT TTC AGG CAG GAA TAG T	AAT TAA ATA GTT TAC TGC TCG TGA TAT	705
	1T62 (-)	AAG GCT TTT CAG GCA GGA ATA GTT T	GTT TTC AAT TCC CCA TTC CCC TAA TT	~100
<i>gst</i>	2T11 (+)	GCG AGA GCT TAG GGT ATC TTG	AAA CAC TCA GCC ATC CCT TTA TAG	397
	2T11 (-)	CTA TTG GCT CAC ATG GAT GCA A	AGA GCA TTG ACC CAT GAG AGA AA	~100
<i>2og-Fe(II)</i>	2T13 (+)	CAT GCA CTG CCA ATC TCA GAG A	ATA ATT TGC CTC ATC ACT ACA TAA GA	334
	2T13 (-)	GCA CTG CCA ATC TCA GAG ATG A	AAG CCC ATC GAG GTA ACT GAT G	~100
<i>thi</i>	2T14 (+)	TTG TGC CTG GGA TGA TTG TTA	AAA GTT CCA AAG CCA TAA AGT AC	827
	2T14 (-)	GGA TGC CAT TGT GAG GCT TAC TA	CCA AAT GTG GGT CCC ATT CTT G	~100
<i>hscp80</i>	2T33 (+)	TGA AGA AGA AGG GGT ATG AGG TTC TGT	CCA CCA ATC TTA AAT ACC TGA CAC GAT	824
	2T33 (-)	GAT TCT GAG GAC CTT CCT CTC A	GAG CTC AAT GCA CTT CTT AAC CAA ATT	~100
<i>β-tubulina</i>	--	GCC ATT ACA CTG AAG GAG CTG A	GTG ACA CAC TTG AAA CCC TTG C	~100

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en geles agarosa al 1.5 %, en buffer TBE 1 X, teñidos con bromuro de etidio (10 mg/mL) a 150 V por 15 min. Se utilizó el marcador de tamaño molecular 1 kb (TrackIt 1kb Plus DNA Ladder de invitrogen), se cargaron 5 µL de producto de PCR.

7.5. Secuenciación de ADN

Una vez obtenidos los fragmentos de los genes de interés se secuenciaron para verificar la identidad de cada uno. La secuenciación del ADN se realizó por el método de dideoxy (Sanger et al., 1977), mediante el sistema comercial DNA Sequencing (BigDye v3.1 Terminador Cycle Sequencing Ready Reaction; Applied Biosystems). Adicionalmente, como control se realizó también la secuenciación de un fragmento del plásmido pGEM[®] Zf (+) (Applied Biosystems Part. No. 360451) y el primer M13 (-21) (Applied Biosystem Part. No. 360364). Se realizaron reacciones de 15 µL en microtubos de 0.2 mL como sigue: 3 µL de la mezcla RR-100 + 5X Sequencing Buffer, 1 µL producto de PCR (del gen de interés), 1 µL Primer forward 50 µM, 10 µL H₂O, (la mezcla RR-100 + 5X Sequencing Buffer se prepara con 3 µL RR-100 y 9 µL 5X Sequencing Buffer). La amplificación se realizó como sigue: desnaturalización a 94 °C por 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 92 °C 30 seg, alineación 50 °C por 15 seg y polimerización a 60 °C por 4 min (Eppendorf Mastercycler ep Gradient). La limpieza de las reacciones se realizó mediante columnas de filtración de Sepadex. El proceso de secuenciación se realizó en un secuenciador ABI prism HITACHI, 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

7.6. Síntesis de ADN de cadena sencilla

Para la síntesis de ADN de cadena sencilla por Transcripción Reversa a partir de los ARN purificados de las muestras biológicas de hoja y raíz, se utilizó el kit comercial Taq Man Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems). Las mezclas de reacción se prepararon en un volumen de 40 µL como sigue: 0.4 µg de ARN total (cuantificado por espectrofotometría), 4 µL de buffer RT 10X, 8.8 µL de MgCl₂ (25 Mm), 8.0 µL de mezcla de dNTPs (2.5 mM), 2 µL de Oligo dT (50 µM), 0.8 µL de

Inhibidor de RNAsas (20 U/L), 1 μ L de Retrotranscriptasa (50 U/ μ L) y agua libre de RNAsas.

Las mezclas de reacción se incubaron a 25 °C por 10 min, y posteriormente a 48 °C por 30 min. Para detener la reacción se incubó a 95 °C por 5 min, se dejó enfriar a 4 °C y para su conservación se almacenó a -70 °C.

7.7. Validación del método para cuantificación relativa

Para asegurar la confiabilidad de los datos obtenidos, validamos el método analítico mediante tres parámetros de desempeño: eficiencia, precisión y especificidad.

Para evaluar la eficiencia se tomó una muestra de ADNc (correspondiente al tiempo de muestreo del día 15 (puesto que en este día se espera que todos los genes se expresen ya que a mayor estrés hídrico se asume una respuesta más acentuada y se garantice una cantidad de transcrito tal que se permita su detección), y se diluyó en serie cinco veces, en una relación 1:5 (una parte de ADNc y cuatro partes de agua). Por cada gen se realizó una curva estándar con cinco puntos (cinco diluciones) y por cada punto se realizó un triplicado de reacciones para medir la precisión. Además para ver la especificidad, al finalizar el protocolo de termociclado se realizaron curvas de disociación para detectar que se hubiera generado una señal característica de los amplicones de los genes de interés. Los parámetros evaluados y los criterios de aceptación se muestran en la Tabla 3. (Applied Biosystems Application note, Nolan et al., 2006).

Tabla 3. Evaluación del desempeño del método.

Parámetro	Desarrollo	Criterio
Eficiencia	Cinco diluciones seriadas 1:5 y obtención de curvas estándar	Pendiente ~ 3.3 (Eficiencia de 90 a 110%)
		$R^2 > 0.99$
Precisión	Mínimo tres replicados	Desviación estándar <0.167
Especificidad	Curvas de disociación	Una señal característica del gen a analizar

7.8. Cuantificación relativa (qPCR)

Para el ensayo de qPCR se utilizó el ADN de cadena sencilla y los juegos de primers específicos para cada gen (Tabla 2). Las mezclas de reacción de qPCR se prepararon en microtubos de 0.2 mL en un volumen total de 20 μ L como sigue: 5 μ L de ADNc , 10 μ L de Power Sybr Green PCR Master Mix, 0.5 μ L de Primer Forward 100 μ M, 0.5 μ L de Primer Reverse 100 μ M, 4.0 μ L de agua.

Las reacciones se corrieron en un termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) mediante el programa Sequence Detection Software 7500 System SDS v1.4 configurando las siguientes condiciones: Stage 1 (1 repetición): 95 °C por 10 minutos, Stage 2 (40 repeticiones): 95 °C por 15 segundos (Paso 1); 60 °C por 1 minuto (Paso 2)., Stage 3 (1 repetición): 95 °C por 15 segundos (Paso 1); 60 °C por 1 minuto (Paso 2); 95 °C por 15 segundos (Paso 3); 60 °C por 15 segundos (Paso 4).

8. RESULTADOS

8.1. Amplificación de fragmentos de genes

En la Figura 1 se muestran los productos de amplificación con el juego de oligonucleótidos de los genes *ltp*, *dpbf* y *badh*. En la Figura 2 se muestran los productos de amplificación de los genes *gst*, *2og-Fe(II)* y *thi*. En la Figura 3 se muestran los productos de amplificación de los genes *hscp80* y *β -tubulina*.

Los juegos de oligonucleótidos utilizados en este estudio fueron previamente diseñados por Porth et al. (2005a, 2005b) (Tabla 2) para amplificaciones a partir de ADN genómico y ARNm como sigue; (+) son específicos para amplificaciones a partir del ADN genómico, y los oligonucleótidos (-) para amplificación a partir de los transcritos. Sin embargo, se probaron los oligos (+) para amplificación de ADNc obteniéndose para los genes *ltp*, *badh* y *thi* fragmentos de menor tamaño que los de ADN genómico, probablemente debido a la supresión de exones en los procesos de splicing. Para los genes, *gst* y *hscp80* los fragmentos de ADNc fueron del mismo tamaño que los de ADN genómico sugiriendo que no existen exones en las regiones amplificadas. Para los genes *dpbf* y *2og-Fe(II)* no se lograron obtener fragmentos de ADNc con los oligos (+) probablemente porque los oligos no eran específicos para la especie estudiada. Se obtuvieron fragmentos de ADNc utilizando los oligos (-) para todos los genes incluyendo al gen *β -tubulina* utilizado como control endógeno en los análisis de qPCR.

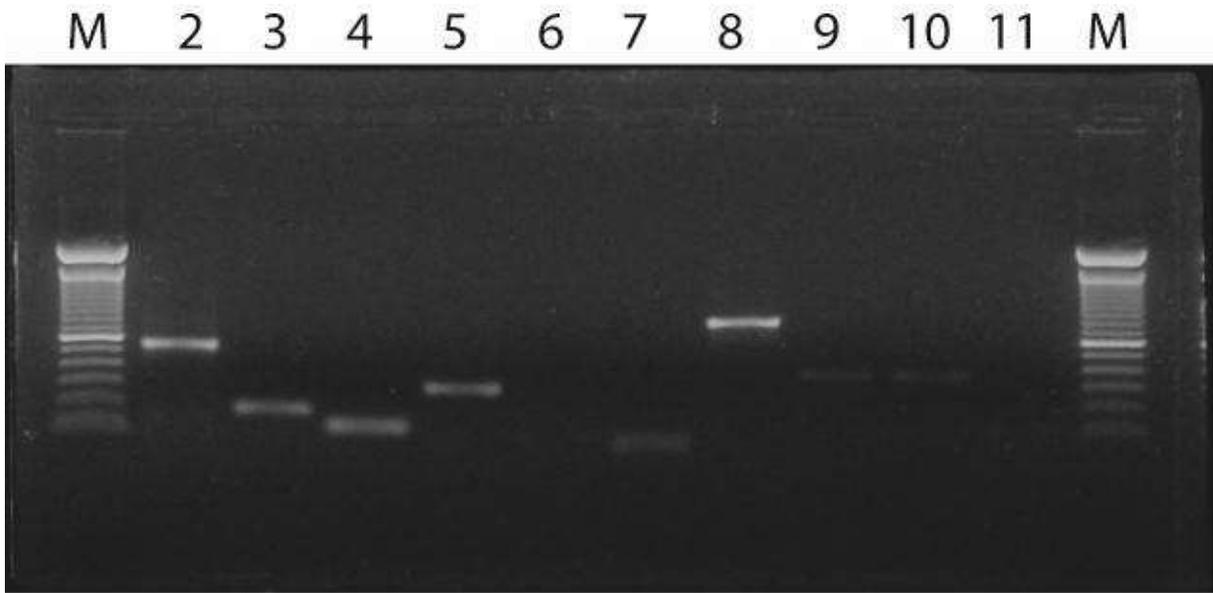


Figura 1. Productos de amplificación de ADN y ADNc para los genes *ltp*, *dpbf* y *badh*. Gel de agarosa al 1% en TBE 1X, teñido con bromuro de etidio. Carriles M, marcador de tamaño molecular de 1000 Kb. Carriles 2-4 gen *ltp*; carril 2 ADN con oligos (+), carril 3 ADNc con oligos (+), carril 4 ADNc con oligos (-). Carriles 5-7 gen *dpbf*; carril 5 ADN con oligos (+), carril 6 ADNc con oligos (+), carril 7 ADNc con oligos (-). Carriles 8-11 gen *badh*; carril 8 ADN con oligos (+), carriles 9 y 10 ADNc con oligos (+), carril 11 ADNc con oligos (-).

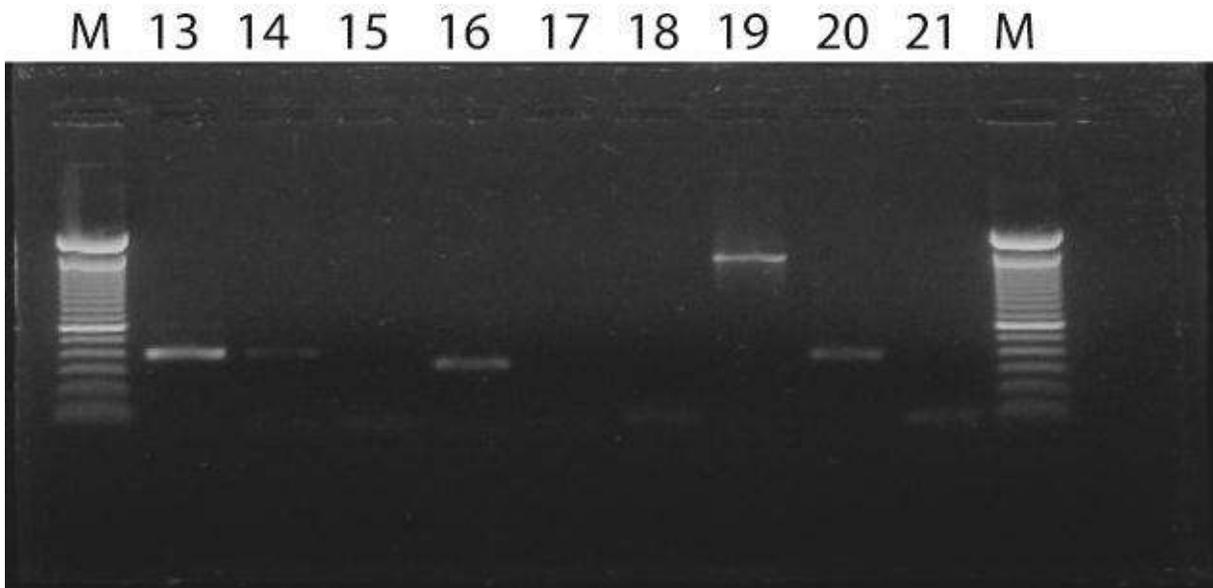


Figura 2. Productos de amplificación de ADN y ADNc para los genes *gst*, *2og-Fe(II)* y *thi*. Gel de agarosa al 1% en TBE 1X, teñido con bromuro de etidio. Carriles M, marcador de tamaño molecular de 1000 Kb. Carriles 13-15 gen *gst*; carril 13 ADN con oligos (+), carril 14 ADNc con oligos (+), carril 15 ADNc con oligos (-). Carriles 16-18 gen *2og-Fe(II)*; carril 16 ADN con oligos (+), carril 17 ADNc con oligos (+), carril 18 ADNc con oligos (-). Carriles 19-21 gen *thi*; carril 19 ADN con oligos (+), carril 20 ADNc con oligos (+), carril 21 ADNc con oligos (-).

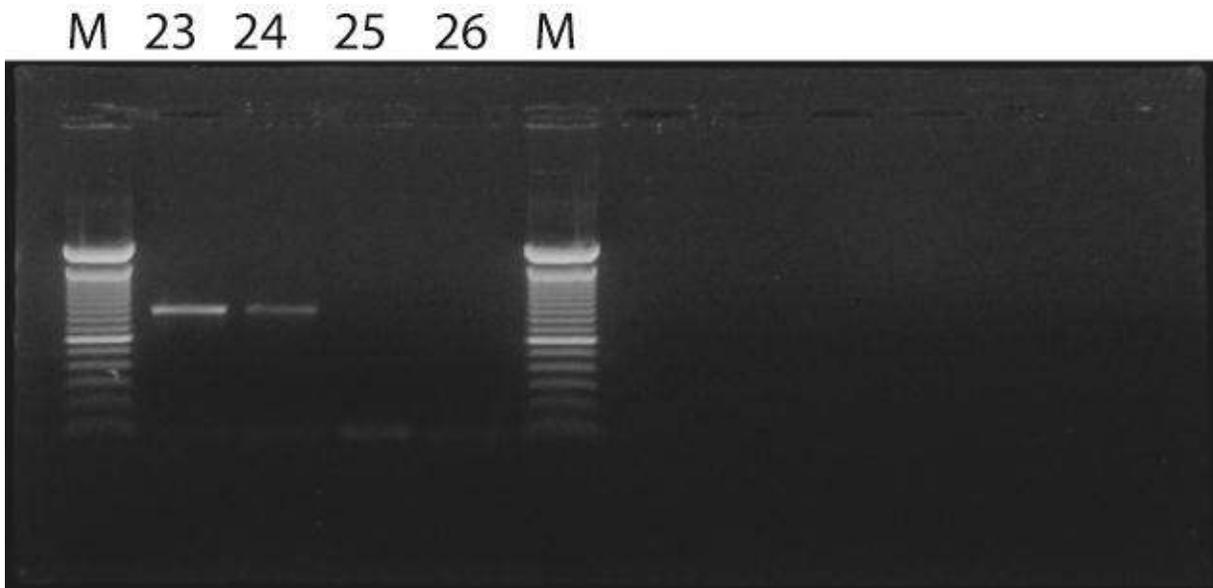


Figura 3. Amplificaciones de los genes *hscp80* y β -*tubulina*. Gel de agarosa al 1% en TBE 1X, teñido con bromuro de etidio. Carriles M, marcador de tamaño molecular 1000 Kb. Carriles 23-25 gen *hscp80*; carril 23 ADN con oligos (+), carril 24 ADNc con oligos (+), carril 25 ADNc con oligos (-). Carril 26 gen β -*tubulina* cADN con oligos (-).

8.2 Análisis de secuencias

Se obtuvieron cinco secuencias de ADN (de los 8 genes mostrados en la Tabla 1) de los productos de amplificación mostrados en los carriles 2, 5, 8, 13, 16, 19 y 23 de las Figuras 1, 2 y 3. Para su análisis las secuencias se compararon con las bases de datos internacionales de NCBI (BLAST) y se identificaron como similares a secuencias parciales de los genes codificantes para la proteína precursora de transferencia de lípidos (*ltp*) (máxima similitud 71%), Factor de unión 2 al promotor Dc3 (*dpbf*) (máxima similitud 76%), betaína aldehído deshidrogenasa (*badh*) (máxima similitud 90%), enzima precursora de thiazol biosintético (*thi*) (máxima identidad 71%), proteína cognada de shock térmico 80 (*hscp80*) (máxima identidad 84%). A continuación se muestran las secuencias obtenidas:

Gen *ltp* (492 nucleótidos)

CAAAAAGTACCTATGCTTGCATTTTTACCCACTTTATCGTTGTGGTTTTAACGTTTTTTTTTTTGTAAACATCACCACCCCTTTTTTTTTACTA
CTAATATAACCTGGCCCGGTTAGGACAGGGACATTATAAAAGTAAGGGTGAGGCTGAATCAAAGTGAAGTTAATCTAATCCTAACCAAACAAG
ACCGCGACTACGATAATGGACATGGTCTTATTCTTACCGTGTGGAGTAGAAATAGAAAGACTAACGAAAGCAGGCGGGCCTTACAATGAA
TATTGTATTGAAATACAGACCTGACCTTGATTGTGTTGGTTGTGTTCTGCGCCAACCGAGAGGGCGAGGTCGGAGTAGCAGATTTTCATCTG
CACACGGCAATAGACTAACATGACAAAAAAAAGAAAATAGGCCAGTCCCGCGCTGCGCCCGCCGGGAGAGGACGTGTTCTTGTGTAT
TTCCTCTTGCCCCGCACACACAAAA

Gen *dpbf* (255 nucleótidos)

CCTGTGCATAGCTCATCTTCTGTGTGAAGCATGTGTGCCACAGGTTTATATTGTGCCAGACTCGTTGTACTTTTTCTCT
ACTGCGGTTCTACAGATGTTTATGCTCAGTACTATGACATAGATTTTCATCTCAAACCTTTGTACATATGCTTTCACAGAT
ATTATACTTGTACACCCTCCCATTTGAGGGCGGAGCCAACCAATAAAATATATATTTTGTAAATAAAAGTATAACACACG
TATTCAAATGCTCA

Gen *badh* (684 nucleótidos)

TAGTGTTAACTAGCTCCAGACCTTGTCTTCTATAAGCTCCAGTGGGGAGGCACAACGTAGTGGTTTTGGACGTGAATTAGGGGAATGGTATG
GCCTTGACTTGTCAAGTTAGAAATGCAAAATATTGTTTAATAAGATGTTCTTAACCCAAGAGCCTGATAGAAAAATGGAGAAATTGCTAGGA
ATTATGTAATAGAAAGAGAGTCCATGGACACAACCTTTAACACTACTTTGATGTTGTTGATTGTGAGTGATGGGTTTCATGTGAAAGTAATGG
TTCACCAATCACAGTCAACCATATCATCAAATTGTAACAAAGTATGTGGTCTAGAAGAACTAAAATTGAATTTGATGTATGAAACATCTTAGA
ACCAGTTTGTAAAGCATTGCTTAATCCTGATTAATCAATGGACAACCTCATGACACTTTATTTTCTTTGCACAGGGGAATTGAAAACCTACC
TGACCGTGAAGCAGGGTTACTCAGTACATTTCTGATGAGCCATGGGGTGGTACCAGTCTCCTTCAAAGCTGTGAGAGTGTCCCTGAAAATC
AAAATGGAATAACTGATGTACTAAATTACGAGGAAATAGATGAGAGGGGTATCATGTATGAATTTGATATGCAATGACTCTGAACAATATT
ATAAAATATCACGAGCAGAAAACCTTTTATATA

Gen *thi* (614 nucleótidos)

CCGGGGTTTTGAAGTGATTAGGTTTGAGCAACTTTACGATGATATGATATTTCTTTTATATATTCTGTGTCTATAAGCTTATAATATGCTAAG
ATCTTTATTCTTGTGCCTGTATGTATCGTTCCAACATGCCAATCACATTATCATCGTAGCCTAGGGGTGCATGGTTGTCAGAGACGAAGATAT
AAAATGGGATAATGGGCTATTATGCGTAGTAATGTGTACCCAAGTGCATAAGGGCTTATGGGTTCTTATGCTCTTATATATTTAGATACTAAT
GTACTGGTGAATGGTGCAGAAATGAAGAGATGTGAAGGCTTAAGGCTATAATGGAGGTAAGGAAGAGATAGAGAGAGAAAAAGAGAAAT
TACATTTGTAAGCCCATTTACTATGACCCCTCTATGATAGAGGGCCCCGACGCAACAGCCATCAGACAGATATGTGAGTTGCACAGGTAT
GGGTGCCCCGAAAGTTTCTTTGCCCAAAGATTACGTGGTCCCATTCATCAATTCGAGCATTATCTTCTCCACGCCATTACCATCCTCCTTT
CGCGCCAAGGCTTTTCTCTGTTGCCAATTATTCCATTTCCAGACAACCAAGACTA

Gen *hscp80* (825 nucleótidos)

```
AAGGAAGGGTTTCGAATCGTCTTCGATTACTATGCTGTTGTCCGGCTTCGGGATTTGAGGGCAGATTGCTTGGTTCTGCTACCAAGGAAGGT
TTGAGACTTGATGAGAGTGAAGATGAGAAGAAGCGACAGGAAGAGTTGAAGGAGAAGTTTGAGGGTCTCTGCCAGGTGATCAAGGATGTTT
TGGGTGACAAGGTTGAGAAAGTTGTGGTTTCTGACCGTGTTCGATTCTCCCTGCTGTTGAGTGACTGGTGAGTATGGATGGACTGCCAAC
ATGGAAGAATCATGAAGGCACAGGCTCTGAGCGACAGCAGCATGACTGGCTACATGTCAAGCAAGAAGACCATGGAGATCAACCCTGAGAA
CTCTATCATGGAGGAGCTCAGGGAAGAGGGCTGATGCTGACAAGAATGACAAATCAGTGAAGGGACCTTGTTCTCCTGCTTTTCGAGACTGC
CCTCCTCACCTCAGGCTTCAGCCTTGACGAACCCAACACCTTTTGCCAACAGGATCCACAGGGATGCTGAAACTCGGTTTGAGCATTGATGAG
GAAGCAGGTGATGGTGATGCTTGAGATGCCTGCATTGGAGGAAGCTGATGCTGATGCTGATGGGCAGAAAGCATCGAAGAAGGATGAATTA
ATTTAAATTTAACACATTATAAGTTTCGGGTGGCTGGTGGATTAGTTTAGATTATAATTTCTTTCCGCCCCGCCACGGGGAAAGTAGGGA
GAATCTTTTGACATTGTTTGTATGGCTTACTTCTGCATTATTTCTATTGACCTGTTTCAGGGAGTTTAAAGAAGTGGGAGGAAGGGGGT
```

8.3 Mediciones de fisiología

Para las mediciones de fisiología correspondientes al análisis en tejido foliar, se obtuvieron las medias de los valores registrados para el grupo control y de las plántulas con supresión de riego para cada una de las tres variables cuantificadas (tasa fotosintética, transpiración, conductancia estomática) en cada fecha de medición (Figuras 4, 5 y 6). Como se observa, los valores promedio de los dos tratamientos se separan a partir del día 10 y se observa en el tratamiento de sequía una disminución progresiva de los valores de las tres variables hasta el día 21. Existen picos y valles en la gráficas posiblemente debido a que en el transcurso del experimento existen variables no controladas como lo son la temperatura y la luminosidad que influyen directamente en las mediciones antes mencionadas. Las medias de los valores registrado para la fotosíntesis, transpiración y conductancia estomática del análisis de tejido radicular (Figuras 7, 8 y 9) tuvieron un comportamiento más irregular que las de tejido foliar, sin embargo los valores arrojados en ambos grupos (tratamiento y control) siguen la misma tendencia, se separan conforme el agua disponible disminuye.

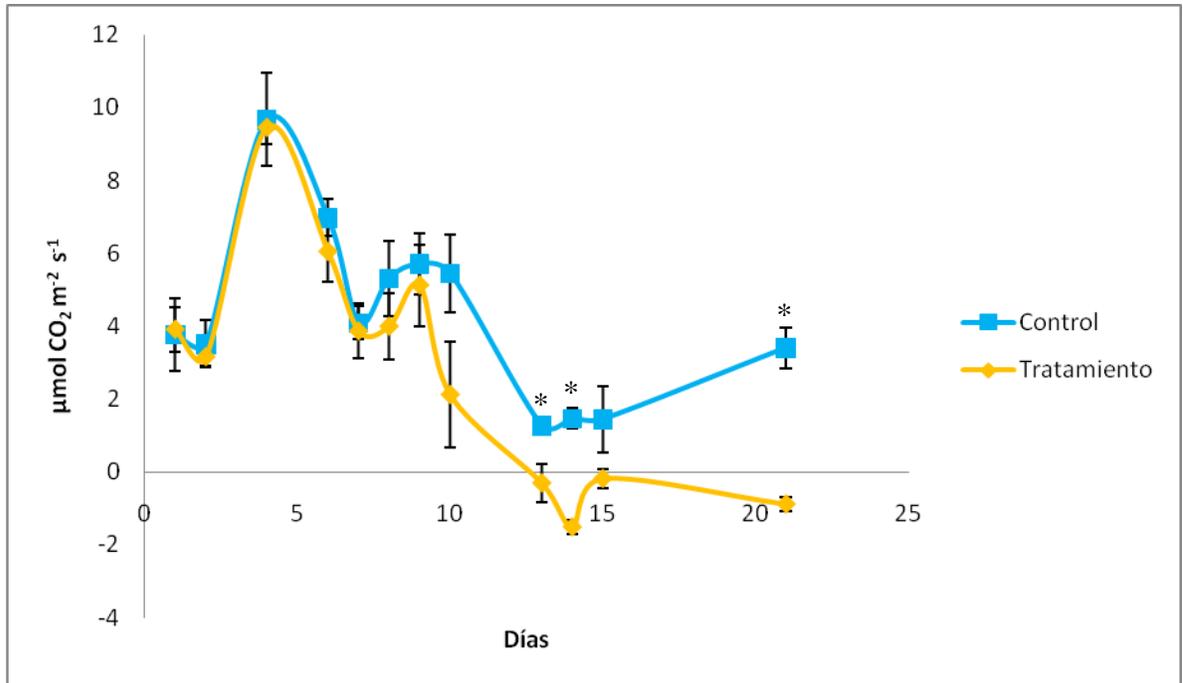


Figura 4. Tasa fotosintética en $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Se muestran las diferencias entre el grupo con tratamiento (estrés hídrico) y control (sin estrés hídrico). Barras de error como error estándar de la media. Los tiempos de muestreo con diferencias significativas entre tratamientos se indican con asterisco (*).

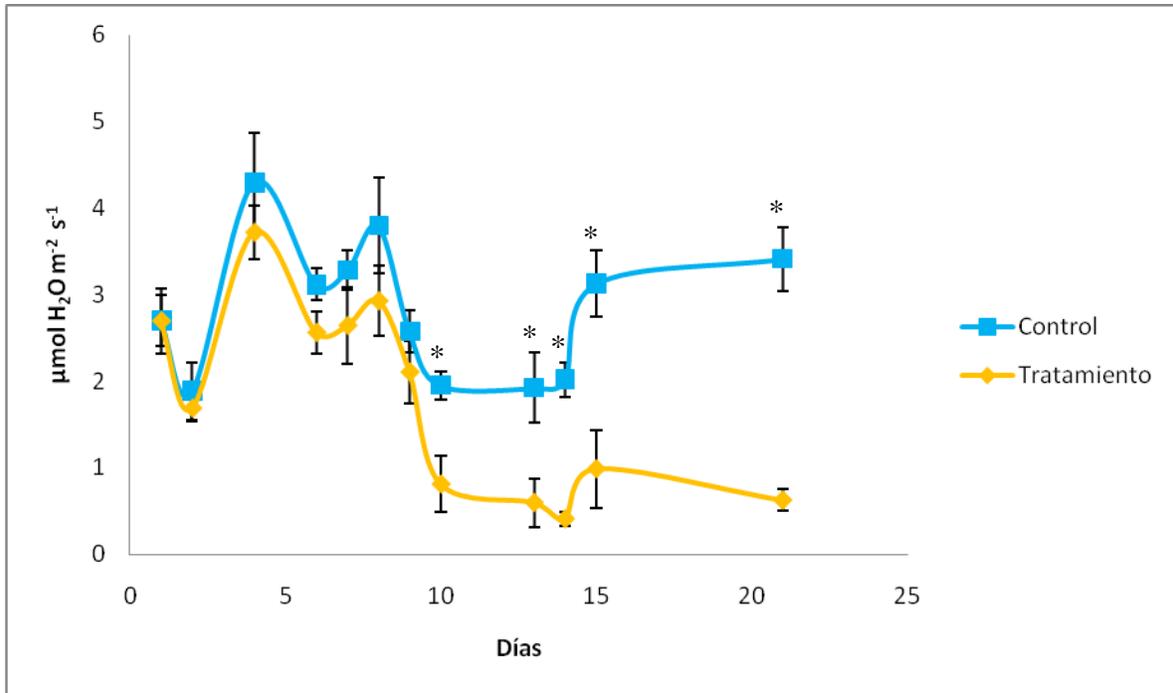


Figura 5. Tasa de transpiración en $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se muestran las diferencias entre el grupo con tratamiento (estrés hídrico) y control (sin estrés hídrico). Barras de error como error estándar de la media. Los tiempos de muestreo con diferencias significativas entre tratamientos se indican con asterisco (*).

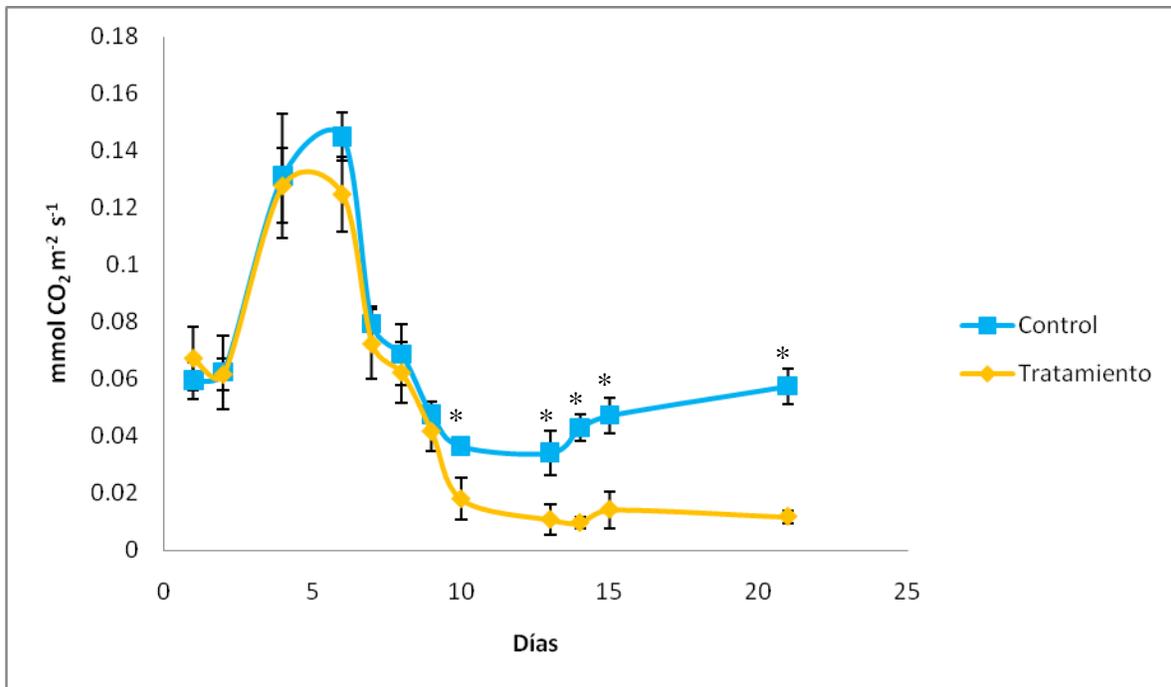


Figura 6. Conductancia estomática en $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se muestran las diferencias entre el grupo con tratamiento (estrés hídrico) y control (sin estrés hídrico). Barras de error como error estándar de la media. Los tiempos de muestreo con diferencias significativas entre tratamientos se indican con un asterisco (*).

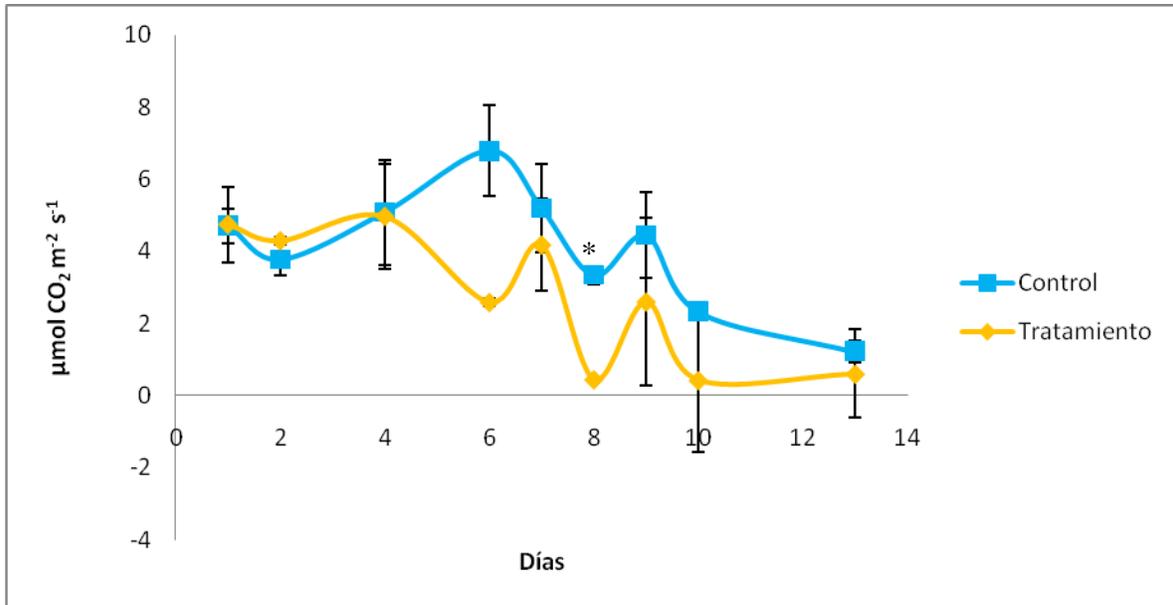


Figura 7. Tasa fotosintética en $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Se muestran las diferencias entre el grupo con tratamiento (estrés hídrico) y control (sin estrés hídrico). Barras de error como error estándar de la media. Los tiempos de muestreo con diferencias significativas entre tratamientos se indican con un asterisco (*).

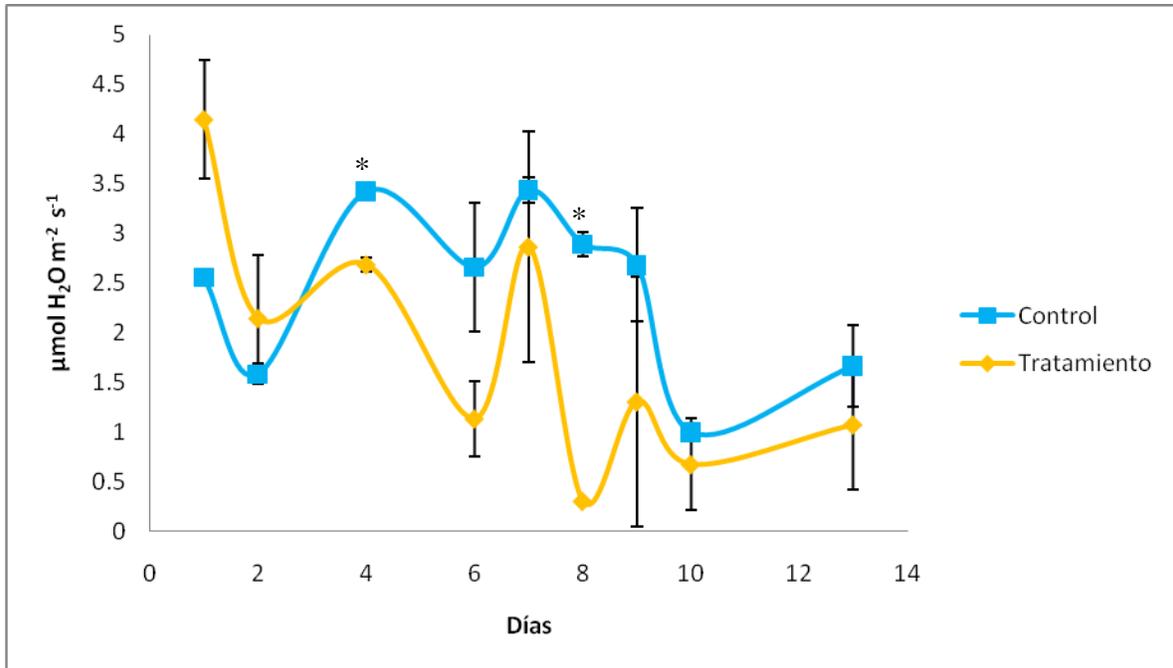


Figura 8. Tasa de transpiración en $\mu\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se muestran las diferencias entre el grupo con tratamiento (estrés hídrico) y control (sin estrés hídrico). Barras de error como error estándar de la media. Los tiempos de muestreo con diferencias significativas entre tratamientos se indican con un asterisco (*).

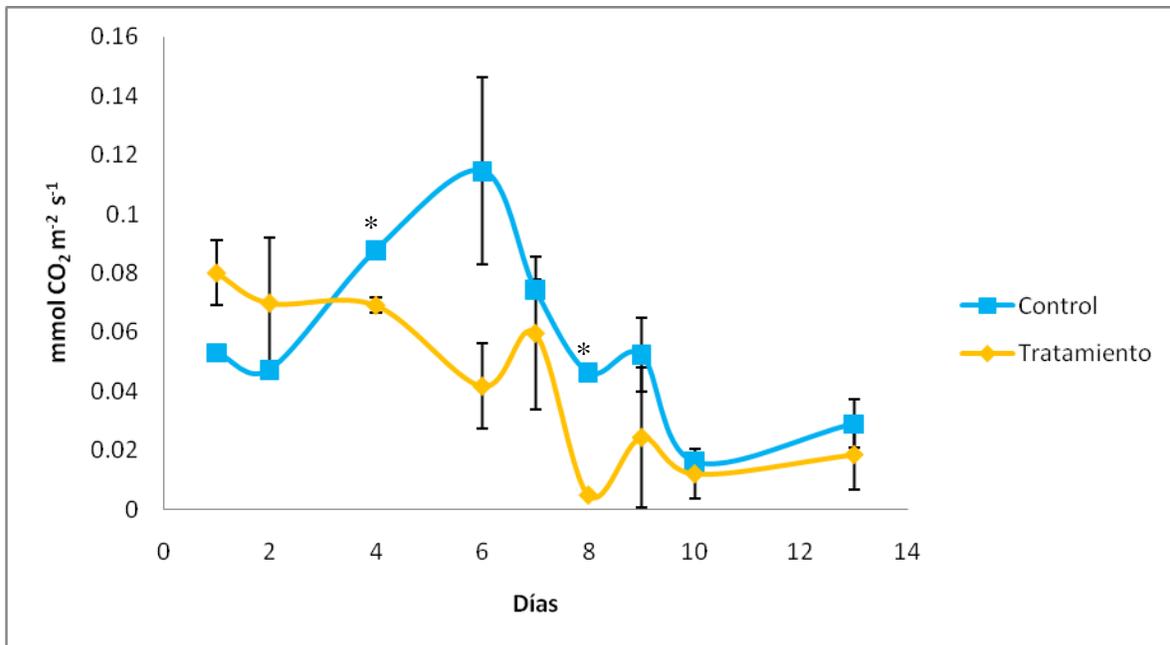


Figura 9. Conductancia estomáca en $\text{mmol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Se muestran las diferencias entre el grupo con tratamiento (estrés hídrico) y control (sin estrés hídrico). Barras de error como error estándar de la media. Los tiempos de muestreo con diferencias significativas entre tratamientos se indican con un asterisco (*).

8.4 Resultados de la validación del método de análisis

En la validación del método analítico de los primers diseñados para amplificaciones de ADNc (Tabla 2), se obtuvieron 8 curvas estándar de las cuales solo 3 cumplieron con los requisitos de validación de acuerdo con los valores de pendiente (m) y coeficiente de correlación (R^2). Específicamente las curvas estándar que cumplieron con los criterios fueron las correspondientes al gen *ltp* ($m = -3.4$ y $R^2 = 0.99$), *thi* ($m = -3.5$ y $R^2 = 0.99$) y *hscp80* ($m = -3.6$ y $R^2 = 0.99$).

8.5 Resultados de los análisis de expresión relativa

Los análisis de cuantificación relativa se realizaron para los genes de los tres pares de oligonucleótidos que cumplieron con los requisitos de validación en las curvas estándar (*ltp*, *thi* y *hscp80*). Como se observa en la Figura 10, el \log_{10} de la expresión relativa de los tres genes en tejido foliar se incrementa sostenidamente conforme

pasa el tiempo y conforme la disponibilidad de agua disminuye en el grupo de plántulas con régimen de sequía.

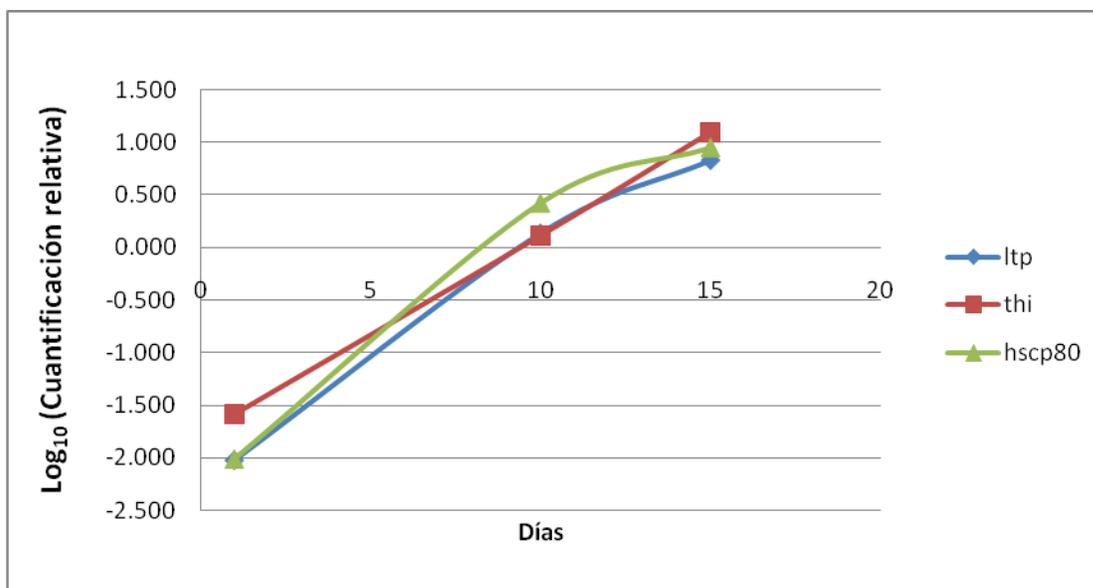


Figura 10. Análisis de la expresión relativa en tejido foliar. En rojo, verde y azul los genes *thi*, *hscp80* y *ltp*, respectivamente.

Aunque las mediciones de fisiología se realizaron en las hojas, la cuantificación de la expresión relativa de los tres genes antes mencionados se llevó a cabo también en las raíces. En este caso la expresión fue algo diferente a las hojas, puesto que los genes *ltp* y *thi* incrementaron levemente su expresión ya en los últimos estadios de la sequía, es decir a partir del día 10, mientras que el gen *hscp80* mantuvo una expresión sostenida desde el principio y un decaimiento (al contrario de los primeros) posterior al día 10 de la sequía (Figura 11).

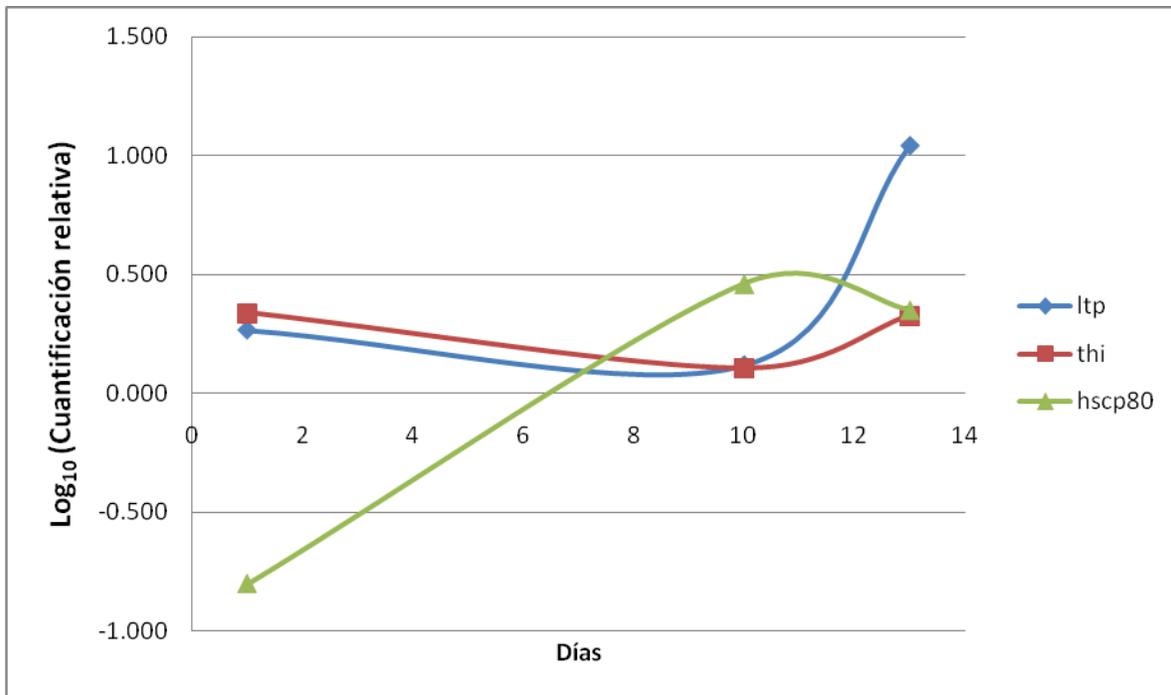


Figura 11. Análisis de expresión relativa en raíces. En rojo, verde y azul los genes *thi*, *hscp80* y *ltp*, respectivamente.

9. DISCUSIÓN

De acuerdo con el reporte del Panel Intergubernamental del Cambio Climático (IPCC) (2007) la temperatura superficial media de la tierra se ha incrementado 0.74°C desde 1850. También se ha reportado que una de las más probables consecuencias del cambio climático son las modificaciones en las precipitaciones, provocando en ciertas áreas la prevalencia de largas y más intensas sequías. La preservación de los bosques de encinos es de considerable importancia para la ecología y economía mexicana, por lo tanto bajo estas condiciones es necesario conocer los mecanismos por el cual los árboles toleran las consecuencias de un cambio climático abrupto.

El presente estudio simula las condiciones de una sequía en plántulas de *Quercus castanea* de 3 años de edad. Como es de esperarse estas toleran las condiciones de privación hídrica por un tiempo mediante diversos mecanismos, hasta que finalmente sucumben. Se destaca la respuesta a nivel fisiológico y de expresión de genes. A futuro y a nivel global se prevé un cambio considerable en el clima, por lo tanto las estrategias de respuesta de los organismos vegetales, en especial de los árboles, determinarán la supervivencia de los individuos, poblaciones o especies.

La primera respuesta inmediata de los bosques a la sequía es reducir la Productividad Primaria Neta (flujo neto de carbón de la atmósfera a las plantas por unidad de tiempo) y el uso del agua. Ambas respuestas son determinadas por la reducción en la humedad del suelo y la conductancia estomática. Bajo condiciones severas las plantas mueren. Las plantas pequeñas como las recién germinadas o los árboles jóvenes son usualmente los primeros en morir y pueden sucumbir incluso bajo condiciones moderadas (Dale et al., 2001).

En condiciones de luz intensa combinados con calor y sequía exacerbados se genera estrés foto-oxidativo. Bajo estas condiciones la respuesta fotoprotectiva puede ser crítica para la supervivencia. La plasticidad fenotípica (la capacidad de un genotipo dado de rendir diferentes fenotipos bajo diferentes condiciones ambientales) juega un papel muy importante como parte de un conjunto de respuestas integradas que

operan en paralelo, representando un continuo y rápido síndrome de aclimatación al estrés. En general algunos de los patrones de cambio en árboles consisten en un decremento de clorofila, ascorbato y Fv/Fm (máxima eficiencia fotoquímica) y un incremento en tocoferol, pigmentos del ciclo de la xantofilas (VAZ) y el índice de de-epoxidación (García-Plazalao et al., 2008).

Sin embargo además de las respuestas bioquímicas y fisiológicas existen respuestas a nivel celular y molecular; entre estas últimas se han reportado en ensayos con microhileras con plantas modelo la respuesta de varios genes ante tres o más tipos de estrés, mientras que otros genes responden de forma exclusiva a un solo tipo de estrés (Seki et al., 2002). En ensayos de deshidratación en *Arabidopsis* se expresan algunos de los genes de interés relacionados con nuestro estudio como lo son los genes que codifican para las proteínas LEA, proteínas de shock térmico y proteínas de transferencia de lípidos. En contraste, algunos genes son reprimidos cuando los especímenes se rehidratan, como los genes de las proteínas de shock térmico, de la glutatión S-transferasa y la enzima de tiazol biosintético (Oono et al; 2003).

Las hojas de las plantas sometidas a condiciones de déficit de agua, así como a tratamientos con cloruro de sodio y ácido abscísico exhiben un incremento significativo en la cantidad de lípidos y cera cuticular (Kosma et al., 2009). De igual forma la expresión del gen *ltp* también muestra incremento bajo esas condiciones. Por ejemplo, en plantas de tabaco la acumulación de ARNm de un miembro de esta familia de proteínas, la NgLTP (*Nicotiana glauca* Lipid Transfer Protein), fue tres veces más alto en plantas expuestas a un solo evento de sequía y 5 veces más alto en plantas que han sido sujetas a tres eventos de sequía, en comparación con plantas bien hidratadas (Cameron et al., 2006). Se ha propuesto que las LTP también juegan un rol de defensa puesto que inhiben el crecimiento de patógenos bacteriales y fungales (García-Olmedo et al., 1995). Sin embargo, el incremento de la expresión de estas proteínas en raíces solo se ha relacionado con la propiedad de defensa en estudios de colonización con un hongo micorrízico, *Glomus mosseae* (Blilou et al., 2000).

La expresión de la enzima tiamina tiazol sintasa (THI) no se ha relacionado con la respuesta a estrés osmótico o hídrico en organismos modelo, pero en los nódulos actinorrhizales formados entre bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Frankia* y la raíces del árbol *Alnus glutinosa* se ha observado que la presencia de esta proteína se incrementa considerablemente, puesto que se requiere de alta actividad glicolítica para proveer energía en la fijación de nitrógeno. La expresión también es alta en órganos fotosintéticos y cotiledones, medianamente en brotes y en menor cuantía en raíces, flores masculinas y frutos inmaduros (Ribeiro et al., 1996).

La proteína cognada de shock térmico 80 (HScP80) solo ha sido descrita una vez en vegetales, específicamente en tomate (Koning et al., 1992). Sin embargo, en *Neurospora crassa* la proteína HSP80 es la más abundante de las proteínas de shock térmico y ha sido agrupada como un miembro de la familia de proteínas de estrés 90 eucariotas, por poseer una marcada homología con estas últimas (Freitag et al., 1997, Girvitz et al., 2000). Por otro lado, en plantas de tabaco se ha reportado la inducción de diversas familias de proteínas de shock térmico en condiciones de calor y sequía, existiendo una expresión mucho más significativa cuando se combinan ambos tipos de estrés, sugiriendo la activación de un programa génico diferente que el activado durante el sometimiento a un solo tipo de estrés (Rizhsky et al., 2002). Un caso similar ha sido descrito en estudios con *Arabidopsis* donde cuatro transcritos de proteínas de shock térmico se expresaron en condiciones de sequía, mientras que 11 lo hicieron en combinación de sequía y calor (Rizhsky et al., 2004). Se ha reportado la acumulación de transcritos de proteínas de shock térmico de bajo peso molecular en tallos y raíces ante estrés por agua (Almoguera et al., 1993). Aunque muchas proteínas de shock térmico se expresan constitutivamente, no se ha reportado una sobreinducción de las proteínas de shock térmico 80 o cognados en respuesta a la carencia de agua en plantas a excepción de este estudio.

10. CONCLUSIONES

Los parámetros fisiológicos de fotosíntesis, conductancia estomática y transpiración variaron significativamente conforme se acentuó el régimen de sequía en plántulas de *Quercus castanea* en comparación con plántulas sometidas a riego óptimo.

Las hojas de plántulas de *Quercus castanea* expresan progresivamente y conforme aumenta el estrés hídrico los genes *ltp*, *thi* y *hscp*. En contraste, en las raíces, los genes *ltp* y *thi* se expresan en los últimos estadios de sequía, y el gen *hscp* se expresa para después reprimirse.

11. LITERATURA CITADA

Alley, R.B., Marotzke, J., Nordhaus, W.D., Overpeck, J.T., Peteet, D.M., Pielke, Jr R.A., Pierrehumbert, R.T., Rhines, P.B., Stocker, T.F., Talley, L.D., Wallace, J.M. 2003. Abrupt Climate Change. *Science* 299:2005-2010.

Al-Whaibi H.M. 2011 Plant heat-shock proteins: A mini review. *Journal of King Saud University – Science*. 23:139-150.

Almoguera, C., Coca, M.A., Jordano, J. 1993. Tissue-specific expression of sunflower heat shock proteins in response to water stress. *The Plant Journal* 4:947-958.

Apel, K., Hirt, H. 2004. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55:373-399.

Applied biosystems. Application note. Real-time PCR: Understanding C_t.

Arizaga, S., Martínez-Cruz, J., Salcedo-Cabrales, M., Bello-González, M.Á. 2009. Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos. México, D.F. Impresora y Encuadernadora Progreso, S.A. de C.V. (iepSa). 147 p.

Bartosz, G. 1997. Oxidative stress in plants. *Acta Physiologiae Plantarum* 19:47-64.

Bernards, M.A. 2002. Demystifyin suberin. *Canadian Journal of Botany* 80:227-240.

Blilou, I., Ocampo, J.A., García-Garrido, J.M. 2000. Induction of Ltp (lipid transferprotein) and Pal (phenylalanine ammonia-lyase) gene expression in rice roots colonized by the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Journal of Experimental Botany* 51:1969-1977.

Blokhina, O., Virolainen, E., Fagerstedt, K.V. 2003. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* 91:179-194.

Bohr, V.A., Dianov, G.L. 1999. Oxidative DNA damage processing in nuclear and mitochondrial DNA. *Biochimie* 81:155-160.

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

Chaves, M.M., Flexas, J., Pinheiro, C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany* 103:551-560.

Chung, H.J., Fu, H.Y., Thomas, T.L. 2005. Abscisic acid-inducible nuclear proteins bind to bipartite promoter elements required for ABA response and embryo-regulated expression of the carrot Dc3 gene. *Planta* 220:424-433.

Cohen, D., Bogeat-Triboulot, M.B., Tisserant, E., Balzergue, S., Martin-Magniette, M.L., Lelandais, G., Ningre, N., Renou, J.P., Tamby, J.P., Le Thiec, D., Hummel, I. 2010. Comparative transcriptomics of drought responses in *Populus*: a meta-analysis of genome-wide expression profiling in mature leaves and root apices across two genotypes. *BMC Genomics* 11:630.

Dale, V.H., Joyce, L.A., McNulty, S., Neilson, R.P., Ayres, M.P., Flannigan, M. D., Hanson, P.J., Irland, L.C., Lugo, A.E., Peterson, C.J., Simberloff, D., Swanson, F.J., Stocks, B.J., Wotton, B.M. 2001. Climate Change and Forest Disturbances. *Bioscience* 51:723-734.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F. 2000. Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57:779-795.

Davies, K.J. 1995. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. *Biochemical Society Symposium* 61:1-31.

Dellaporta, S.J., Wood, J., Hicks, B.J. 1983. A plant DNA miniprep: versión II. *Plant Molecular Biology* 1:19-21.

Derory, J., Léger, P., Garcia, V., Schaeffer, J., Hauser, M.T., Salin, F., Luschnig, C., Plomion, C., Glössl, J., Kremer, A. 2006. Transcriptome analysis of bud burst in sessile oak (*Quercus petraea*). *New Phytologist* 170:723-738.

Dixon, P.D., Laphorn, A., Edwards, R. 2002. Plant glutathione transferases. *Genome Biology* 3:1-10.

Efeoglu, B. 2009. Heat shock proteins and heat shock response in plants. *Gazi University Journal of Science* 22:67-75.

Foyer, C.H., Noctor, G. 2005. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* 8:1056-1071.

Freitag, D.G., Ouimet, P.M., Girvitz, T.L., Kapoor, M. 1997. Heat shock protein 80 of *Neurospora crassa*, a cytosolic molecular chaperone of the eukaryotic stress 90 family, interacts directly with heat shock protein 70. *Biochemistry* 36:10221-10229.

García-Plazaola, J.I., Esteban, R., Hormaetxe, K., Fernández-Marín, B., Becerril, J.M. 2008. Photoprotective responses of Mediterranean and Atlantic trees to the extreme heat-wave of summer 2003 in Southwestern Europe. *Trees-structure and function* 22:385-392.

Galmés, J., Flexas, J., Savé, R., Medrano, H. 2007. Water relations and stomatal characteristics of Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits: responses to water stress and recovery. *Plant Soil* 290:139-155.

García-Olmedo, F., Molina, A., Segura, A., Moreno, M. 1995. The defensive role of nonspecific lipid-transfer proteins in plants. *Trends in Microbiology* 3:72-74.

Gniwotta, F., Vogg, G., Gartmann, V., Carver, T.L., Riederer, M., Jetter, R. 2005. What do microbes encounter at the plant surface? Chemical composition of pea leaf cuticularwaxes. *Plant Physiology* 139:519-530.

Godoi, P.H., Galhardo, R.S. Luche, D.D., Van Sluys, M.A., Menck, C.F., Oliva, G. 2006. Structure of the thiazole biosynthetic enzyme THI1 from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 281:30957-30966.

Goldberg, R.B., de Paiva, G., Yadegari, R. 1994. Plant embryogenesis: zygote to seed. *Science* 266:605-614.

Goyal, K., Walton, L.J., Browne, J.A., Burnell, A.M., Tunnacliffe, A. 2005. Molecular anhydrobiology: identifying molecules implicated in invertebrate anhydrobiosis. *Integrative and Comparative Biology* 45:702-709.

Greer, S., Wen, M., Bird, D., Wu, X., Samuels, L., Kunst, L., Jetter, R. 2007. The cytochrome P450 enzyme CYP96A15 is the midchain alkane hydroxylase responsible for formation of secondary alcohol and ketones in stem cuticular wax of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 145:653-667.

Girvitz, T.L., Ouimet, P.M., Kapoor, M. 2000. Heat shock protein 80 of *Neurospora crassa*: sequence analysis of the gene and expression during the asexual phase. *Canadian Journal of Microbiology* 46:981-991.

Gupta, S.C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R.K., Chowdhuri, D.K. 2010. Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life Sciences* 86:377-384.

Hoh, F., Pons, J.L., Gautier, M.F., de Lamotte, F., Dumas, C. 2005. Structure of a liganded type 2 non-specific lipid-transfer protein from wheat and the molecular basis of lipid binding. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography* 61:397-406.

Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F., bZIP Research Group. 2002. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends in Plant Science* 7:106-111.

Jump, S.A., Peñuelas, J. 2005. Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecology letters* 8:1010-1020.

Jurgenson, C.T., Begley, T.P., Ealick, S.E. 2009. The structural and biochemical foundations of thiamin biosynthesis. *Annual Review of Biochemistry* 78:569-603.

Kader, J.C. 1996. Lipid-Transfer Proteins In Plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:627-654.

Kandel, S., Sauveplane, V., Olry, A., Diss, L., Benveniste, I., Pinot, F. 2006. Cytochrome P450-dependent fatty acid hydroxylases in plants. *Phytochemistry Reviews* 5:359-372.

Kampranis, S.C., Damianova, R., Atallah, M., Toby, G., Kondi, G., Tsihchlis, P.N., Makris, A.M. 2000. A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast. *The Journal of Biological Chemistry* 275:29207-29216.

Kim, S.Y., Ma, J., Perret, P., Li, Z., Thomas, T.L. 2002. *Arabidopsis* ABI5 subfamily members have distinct DNA-binding and transcriptional activities. *Plant Physiology* 130:688-697.

Kim, S.Y., Chung, H.J., Thomas, T.L. 1997. Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *The Plant Journal* 11:1237-1251.

Kohen, R., Nyska, A. 2002. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* 30:620-650.

Koning, A.J., Rose, R., Comai, L. 1992. Developmental expression of tomato heat-shock cognate protein 80. *Plant Physiology* 100:801-811.

Kosma, D.K., Bourdenx, B., Bernard, A., Parsons, E.P., Lü, S., Joubès, J., Jenks, M.A. 2009. The impact of water deficiency on leaf cuticle lipids of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 151:1918-1929.

Kreps, J.A., Wu, Y., Chang, H.S., Zhu, T., Wang, X., Harper, J.F. 2002. Transcriptome Changes for *Arabidopsis* in Response to Salt, Osmotic, and Cold Stress. *Plant Physiology* 130:2129-2141.

Kumar, S., Dhingra, A., Daniell, H. 2004. Plastid-Expressed Betaine Aldehyde Dehydrogenase Gene in Carrot Cultured Cells, Roots, and Leaves Confers Enhanced Salt Tolerance. *Plant Physiology* 136:2843-2854.

Liverman, M.D., O'Brien, L.K. 1991. Global warming and climate change in Mexico. *Global Environmental Change* 1:351-364.

Le Provost, G., Sulmon, C., Frigerio, J.M., Bodénès, C., Kremer, A., Plomion, C. 2012. Role of waterlogging-responsive genes in shaping interspecific differentiation between two sympatric oak species. *Tree Physiology* 32:119-34.

Loenarz, C., Schofield, C.J. 2008. Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. *Nature Chemical Biology* 4:152-156.

Loenarz, C., Schofield, C.J. 2011. Physiological and biochemical aspects of hydroxylations and demethylations catalyzed by human 2-oxoglutarate oxygenases. *Trends in Biochemical Sciences* 36:7-18.

Luo, L., Pappalardi, M.B., Tummino, P.J., Copeland, R.A., Fraser, M.E., Grzyska, P.K., Hausinger, R.P. 2006. An assay for Fe(II)/2-oxoglutarate-dependent dioxygenases by enzyme-coupled detection of succinate formation. *Analytical Biochemistry* 353:69-74.

Machado, C.R., de Oliveira, R.L., Boiteux, S., Praekelt, U.M., Meacock, P.A., Menck, C.F. 1996. Thi1, a thiamine biosynthetic gene in *Arabidopsis thaliana*, complements bacterial defects in DNA repair. *Plant Molecular Biology* 31:585-593.

Machado, C.R., Praekelt, U.M., de Oliveira, R.C., Barbosa, A.C., Byrne, K.L., Meacock, P.A., Menck, C.F. 1997. Dual role for the yeast THI4 gene in thiamine biosynthesis and DNA damage tolerance. *Journal of Molecular Biology* 273:114-121.

Marrs, A.K. 1996. The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:127-158.

Matzke, K., Riederer, M. 1991. A comparative study into the chemical constitution of cutins and suberins from *Picea abies* (L.) Karst., *Quercus robur* L., and *Fagus sylvatica* L. *Planta* 185:233-245.

Mawdsley, J.R., O'Malley, R., Ojima, D.S. 2009. A review of climate-change adaptation strategies for wildlife management and biodiversity conservation. *Conservation Biology* 23:1080-1089.

Mayer, U., Torres, R.R.A., Berleth, T., Miéra, S., Jürgens, G. 1991. Mutations affecting body organization in the Arabidopsis embryo. *Nature* 353:402-407.

McDonough, M.A., Loenarz, C., Chowdhury, R., Clifton, I.J., Schofield, C.J. 2010. Structural studies on human 2-oxoglutarate dependent oxygenases. *Current Opinion in Structural Biology* 20:659-672.

Nicchitta, V.C. 2009. Cell biology: How to combat stress. *Nature* 457:668-669.

Minibayeva, F., Dmitrieva, S., Ponomareva, A., Ryabovol, V. 2012. Oxidative stress-induced autophagy in plants: The role of mitochondria. *Plant Physiology and Biochemistry*. (En prensa).

Mittler, R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:405-410.

Müller, C., Riederer, M. 2005. Plant surface properties in chemical ecology. *Journal of Chemical Ecology* 31:2621-2651.

Newman, P.A., Nash, E.R., Kawa, S.R., Montzka, S.A., Schauffler, S.M. 2006. When will the Antarctic ozone hole recover?. *Geophysical Research Letters* 33(L12814):1-5.

Nieuwland, J., Feron, R., Huisman, B.A., Fasolino, A., Hilbers, C.W., Derksen, J., Mariani, C. 2005. Lipid transfer proteins enhance cell wall extension in tobacco. *Plant Cell* 17:2009-2019.

Nolan, T., Hands, R.E., Bustin, S.A. 2006. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR. *Nature Protocols* 1:1559-1582.

Noctor, G., Foyer, C.H. 1998. Ascorbate and Glutathione: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49:249-279.

Oono, Y., Seki, M., Nanjo, T., Narusaka, Fujita, M., Satoh, R; Satou, M., Sakurai, T., Ishida, J., Akiyama, K., Iida, K., Maruyama, K., Satoh, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. 2003. Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using *ca.* 7000 full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 34:868-887.

Oreskes, N. 2004. The Scientific Consensus on Climate Change. *Science* 306:1686.

Öztetik, E. 2008. A Tale of Plant Glutathione S-Transferases: Since 1970. *The Botanical Review* 74:419-437.

Post-Beittenmiller, D. 1996. Biochemistry and molecular biology of wax production in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47:405-430.

Porth, I., Scotti-Saintagne, C., Barreneche, T., Kremer, A., Burg, K. 2005a. Linkage mapping of osmotic stress induced genes of oak. *Tree genetics & genomes* 1: 31-40.

Porth, I., Koch, M., Berenyi, M., Burg, A., Burg, K. 2005b. Identification of adaptation-specific differences in mRNA expression of sessile and pedunculate oak based on osmotic-stress-induced genes. *Tree Physiology* 25:1317-1329.

Potters, G., Horemans, N., Jansen, M.A. 2010. The cellular redox state in plant stress biology-a charging concept. *Plant Physiology and Biochemistry* 48:292-300.

Rathinasabapathi, B. 2000. Metabolic Engineering for Stress Tolerance: Installing Osmoprotectant Synthesis Pathways. *Annals of Botany* 86:709-716.

Rzedowski, J. 1991. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana*. 014:3-21.

Roldán-Arjona, T., Ariza, R.R. 2009. Repair and tolerance of oxidative DNA damage in plants. *Mutation Research* 681:169-179.

Rhee, Y., Hlousek-Radojic, A., Ponsamuel, J., Liu, D., Post-Beittenmiller, D. 1998. Epicuticular wax accumulation and fatty acid elongation activities are induced during leaf development of leeks. *Plant Physiology* 116:901-911.

Ribeiro, A., Praekelt, U., Akkermans, A.D., Meacock, P.A., van Kammen, A., Bisseling, T., Pawlowski, K. 1996. Identification of *agthi1*, whose product is involved in biosynthesis of the thiamine precursor thiazole, in actinorhizal nodules of *Alnus glutinosa*. *The Plant Journal* 10:361-368.

Rizhsky, L., Liang, H., Mittler, R. 2002. The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology* 130:1143-1151.

Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., Mittler, R. 2004. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* 134:1683-1696.

Salisbury, F.B., Ross, C.W. 1994 *Fisiología Vegetal*. México. Grupo Editorial Iberoamericana S.A. 759 p.

Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Taji, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K. 2002a. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 31: 279-292.

Seki, M., Ishida, J., Narusaka, M., Fujita, M., Nanjo, T., Umezawa, T., Kamiya, A., Nakajima, M., Enju, A., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Kawai, J., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K. 2002b. Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Functional & Integrative Genomics* 2:282-291.

Seki, M., Narusaka, M., Abe, H., Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K. 2001. Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* 13: 61-72.

Schwanz, P., Picon, C., Vivin, P., Dreyer, E., Guehl, J.M., Polle, A. 1996. Responses of Antioxidative Systems to Drought Stress in Pendunculate Oak and Maritime Pine as Modulated by Elevated CO₂. *Plant Physiology*. 110:393-402.

Taiz, L., Zeiger, E. 2006. *Plant Physiology* 3ed. Sinauer Associates, Inc. 690 p.

Tuteja, N., Singh, M.B., Misra, M.K., Bhalla, P.L., Tuteja, R. 2001. Molecular mechanisms of DNA damage and repair: progress in plants. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 36:337-397.

Thuiller, W. 2007. Biodiversity: Climate change and the ecologist. *Nature* 448:550-552.

Twitchett, J.R. 2006. The palaeoclimatology, palaeoecology and palaeoenvironmental analysis of mass extinction events. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 232:190-213.

Tyree, M.T., Engelbrecht, B.M., Vargas, G; Kursar, T.A. 2003. Desiccation tolerance of five tropical seedlings in panama. Relationship to a field assessment of drought performance. *Plant Physiology* 132:1439-1447.

Valencia, A.S. 2004. Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 075:33-53.

Villers-Ruiz, L., Trejo-Vázquez. 1997. Assessment of the vulnerability of forest ecosystems to climate change in México. *Climate Research* 9:87-93.

Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9:244-252.

Wang, W., Vinocur, B., Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218:1-14.

Waterworth, W.M., Drury, G.E., Bray, C.M., West, C.E. 2011. Repairing breaks in the plant genome: the importance of keeping it together. *New Phytologist* 192:805-822.

Welford, R.W.D., Kirkpatrick, J.M., McNeill, L.A., Puric, M., Oldham, N.J., Schofield, J.C. 2005. Incorporation of oxygen into the succinate co-product of iron(II) and 2-oxoglutarate-dependent oxygenases from bacteria, plants and humans. *FEBS Letters* 579:5170-5174.

Weretilnyk, E.A., Hanson, A.D. 1990. Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87:2745-2749.

Wilmouth, R.C., Turnbull, J.J., Welford, R.W., Clifton, I.J., Prescott, A.G., Schofield, C.J. 2002. Structure and mechanism of anthocyanidin synthase from *Arabidopsis thaliana*. *Structure* 10:93-103.

Winkel-Shirley B. 2002. Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5:218-223.

Wise, M.J. 2003. LEAPing to conclusions: A computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatics* 4:52.

Wood, A.J., Saneoka, H., Rhodes, D., Joly, R.J., Goldsbrough, P.B. 1996. Betaine Aldehyde Dehydrogenase in Sorghum (Molecular Cloning and Expression of Two Related Genes). *Plant Physiology* 110:1301-1308

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

Yang, X., Liang, Z., Lu, C. 2005. Genetic engineering of the biosynthesis of glycinebetaine enhances photosynthesis against high temperature stress in transgenic tobacco plants. *Plant Physiology* 138:2299-2309.

Yeats, T.H., Rose, J.K. 2008. The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Science*. 17:191-198.

Yi, C., Jia, G., Hou, G., Dai, Q., Zhang, W., Zheng, G., Jian, X., Yang, C.G., Cui, Q., He, C. 2010. Iron-catalysed oxidation intermediates captured in a DNA repair dioxygenase. *Nature* 468:330-333.

12. APENDICE DE RESULTADOS

12.1. Gráficas de los resultados de validación

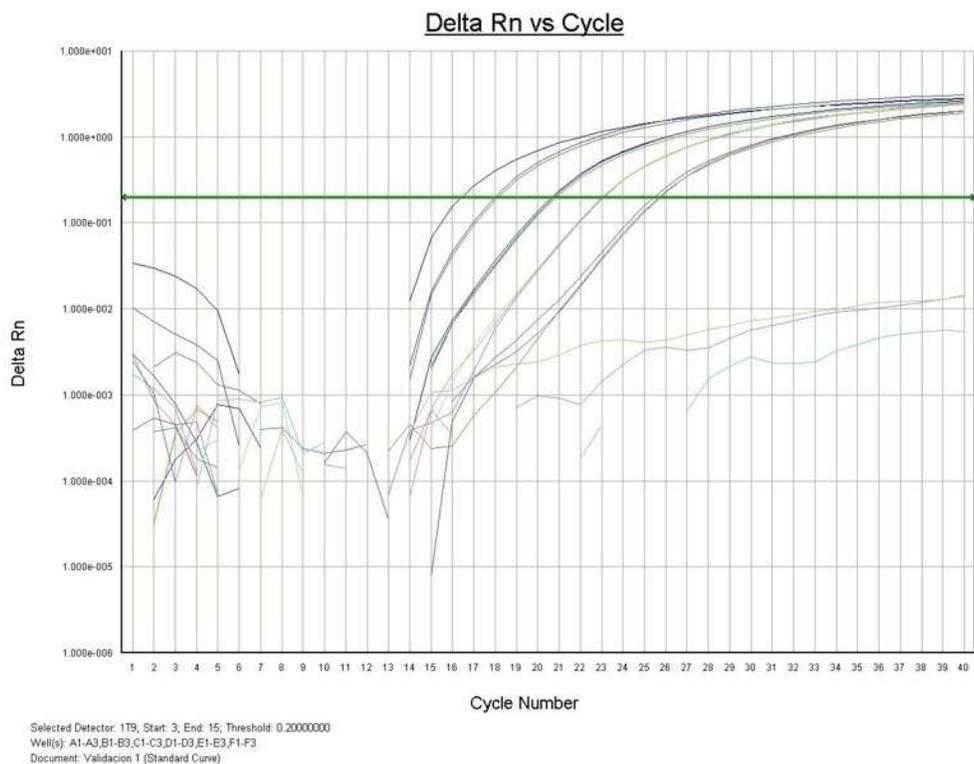


Figura 12. Plot de amplificación de diluciones 1:5 de cDNA para la validación del gen proteína precursora de transferencia de lípidos (*ltp*).

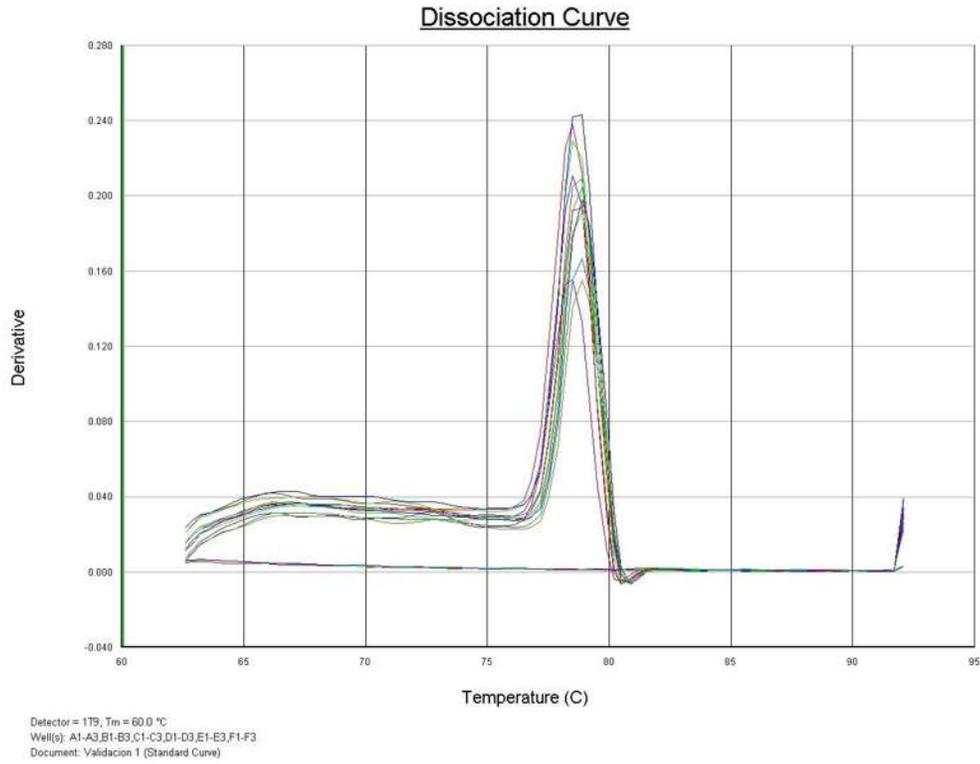


Figura 13. Curvas de disociación de diluciones 1:5 de cDNA para la validación del gen proteína precursora de transferencia de lípidos (*ltp*).

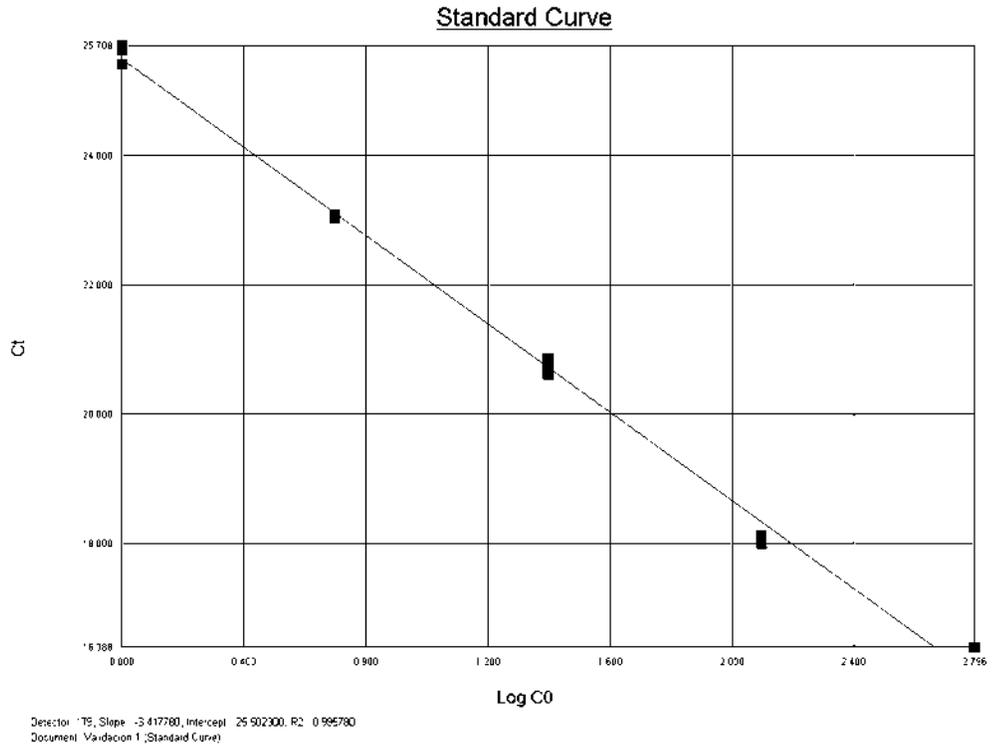


Figura 14. Curva estándar del gen proteína precursora de transferencia de lípidos (*ltp*). Pendiente: -3.4, R^2 :0.99.

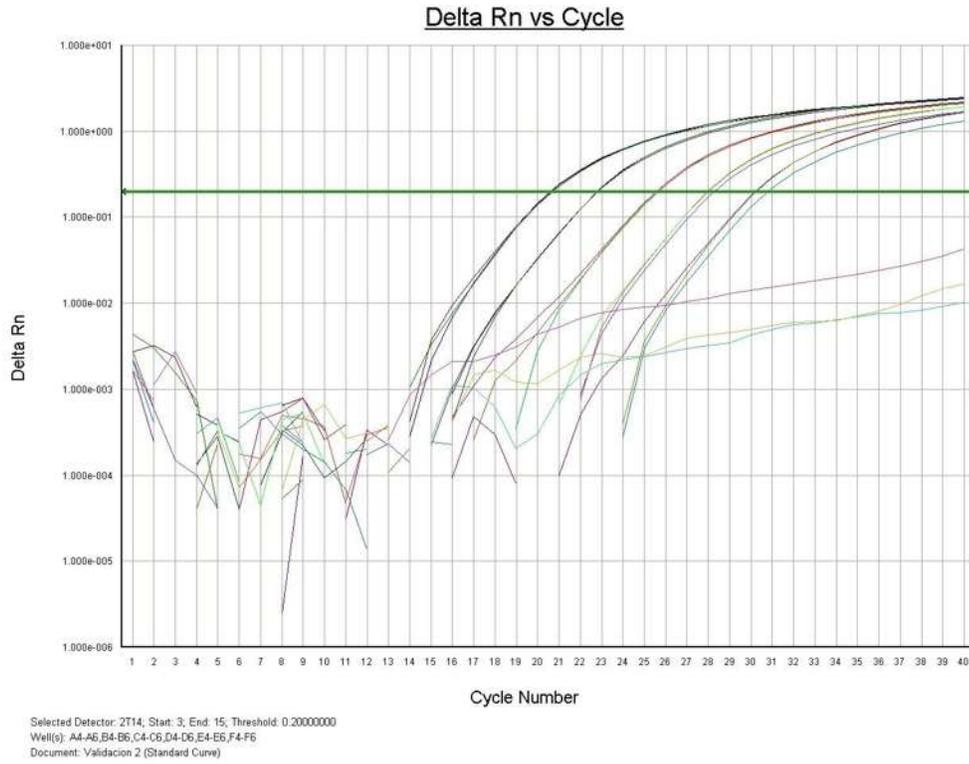


Figura 15. Plot de amplificación de diluciones 1:5 de cDNA para la validación del gen proteína precursora de tiazol biosintético (*thi*).

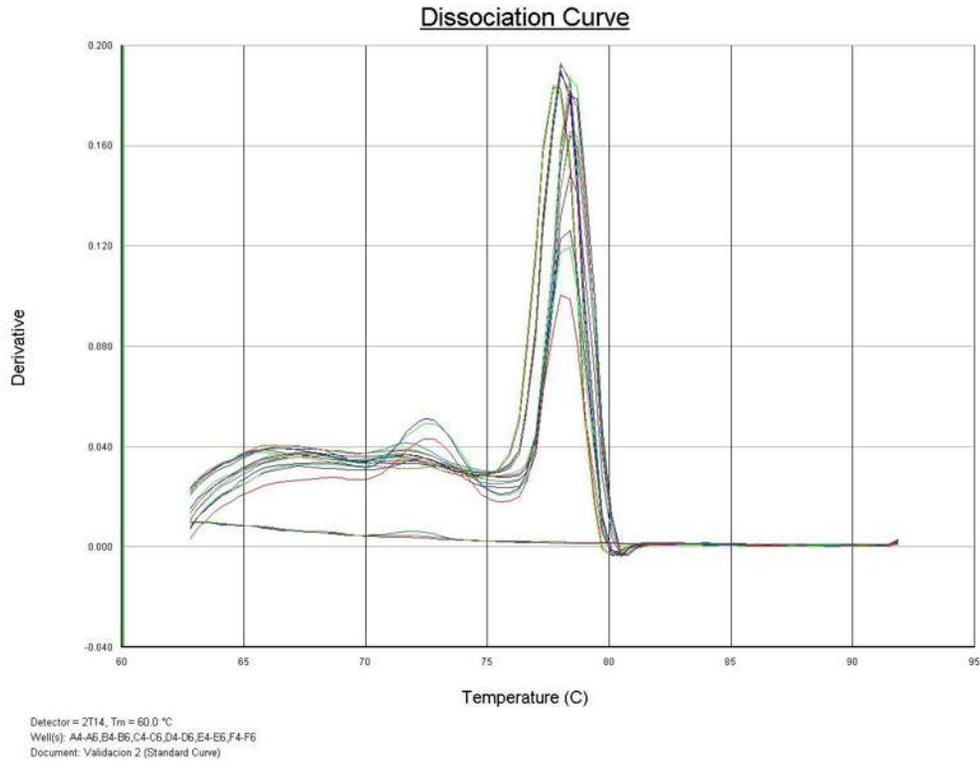


Figura 16. Curvas de disociación de diluciones 1:5 de cDNA para la validación del gen proteína precursora de tiazol biosintético (*thi*).

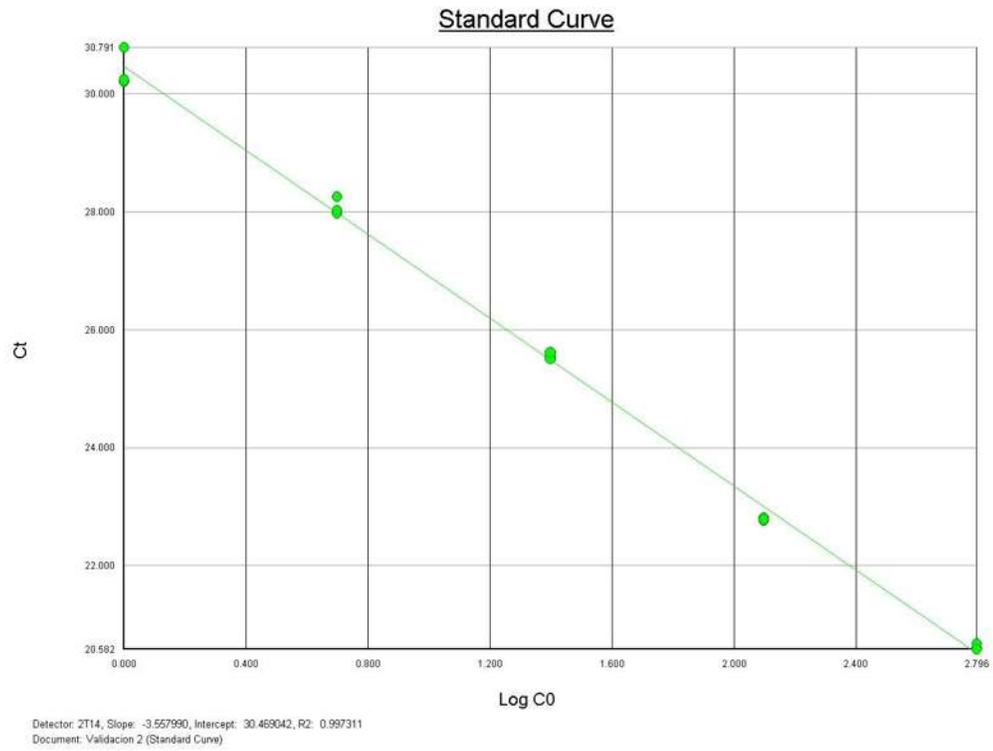


Figura 17. Curva estándar del gen proteína precursora de tiazol biosintético (*th*). Pendiente: -3.5, R^2 :0.99.

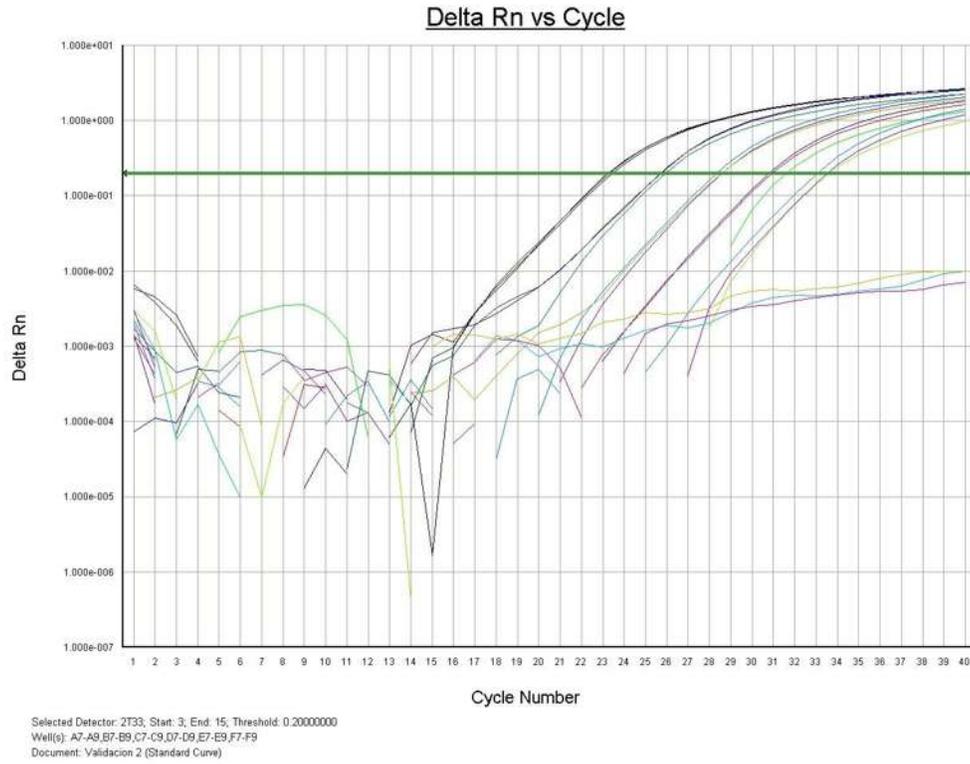


Figura 18. Plot de amplificación de diluciones 1:5 de cDNA para la validación del gen proteína cognada de shock térmico 80 (*hscp80*).

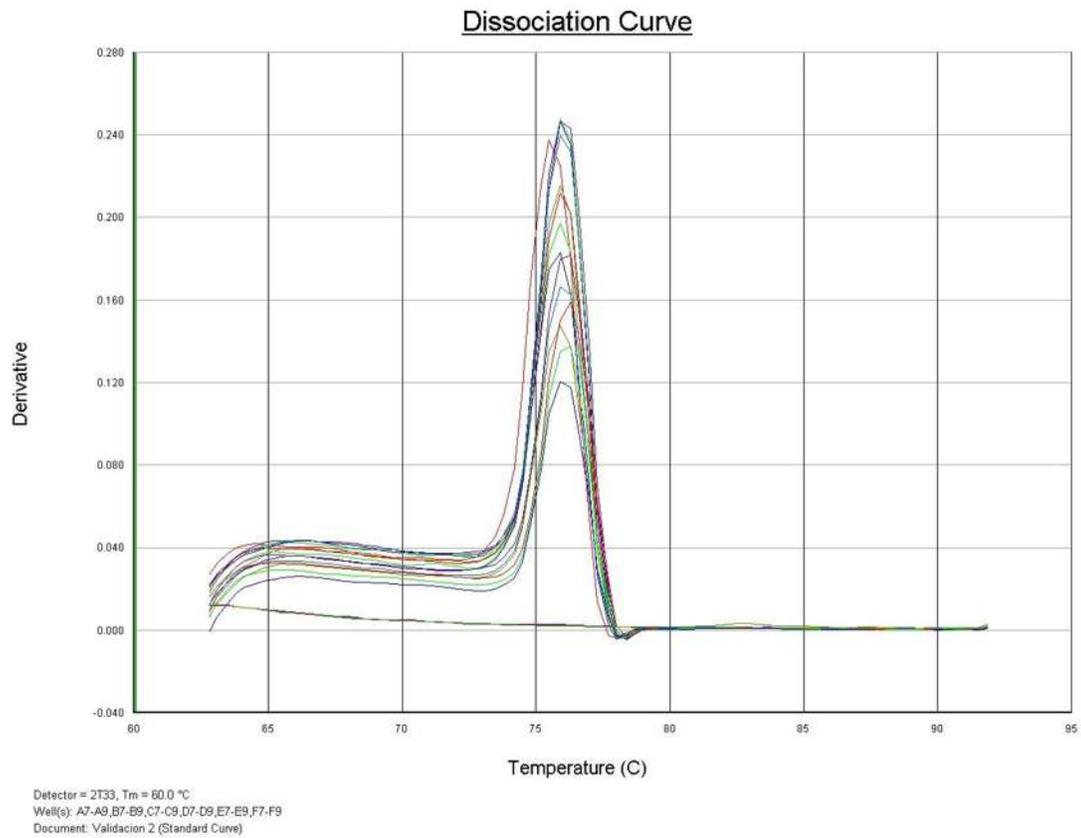


Figura 19. Curvas de disociación de diluciones 1:5 de cDNA para la validación del gen proteína cognada de shock térmico 80 (*hscp80*).

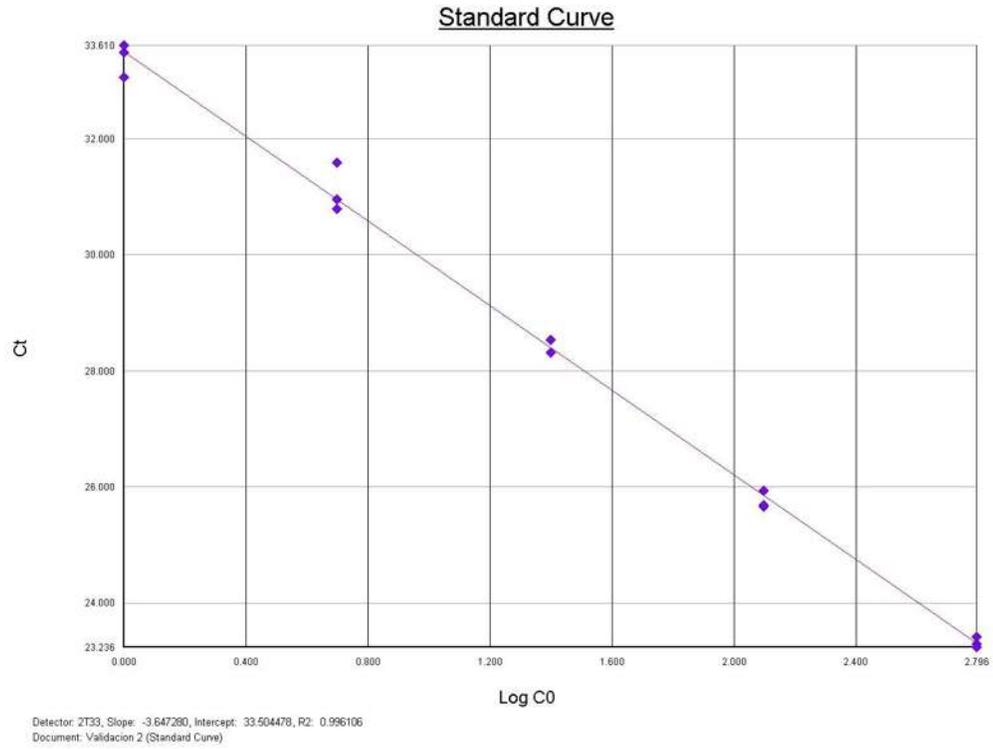
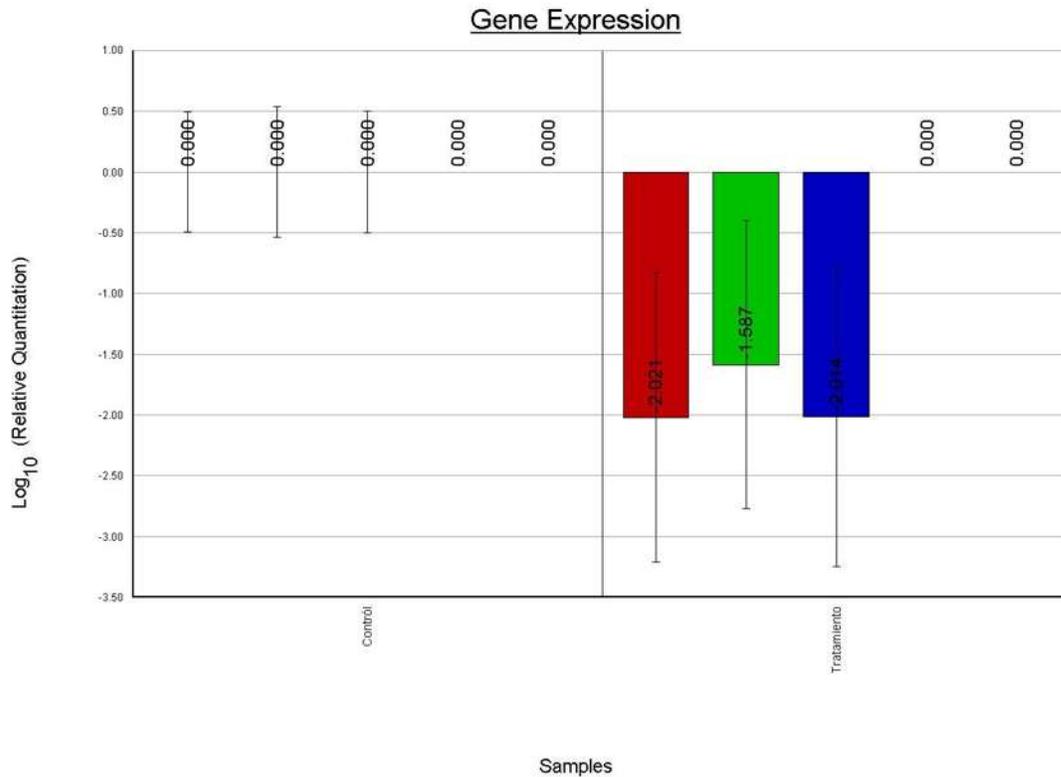


Figura 20. Curva estándar del gen proteína cognada de shock térmico 80 (*hscp80*). Pendiente: -3.6, R^2 :0.99.

12.2. Gráficas de los resultados de la expresión relativa por tiempo de muestreo



Document: Análisis de hojas 18abr2010 (ddCt Study)

Figura 21. Expresión relativa en hojas del ensayo 1 (Día 1), En rojo, verde y azul los genes *ltp*, *thi* y *hscp80* respectivamente. Barras de error como error estándar.

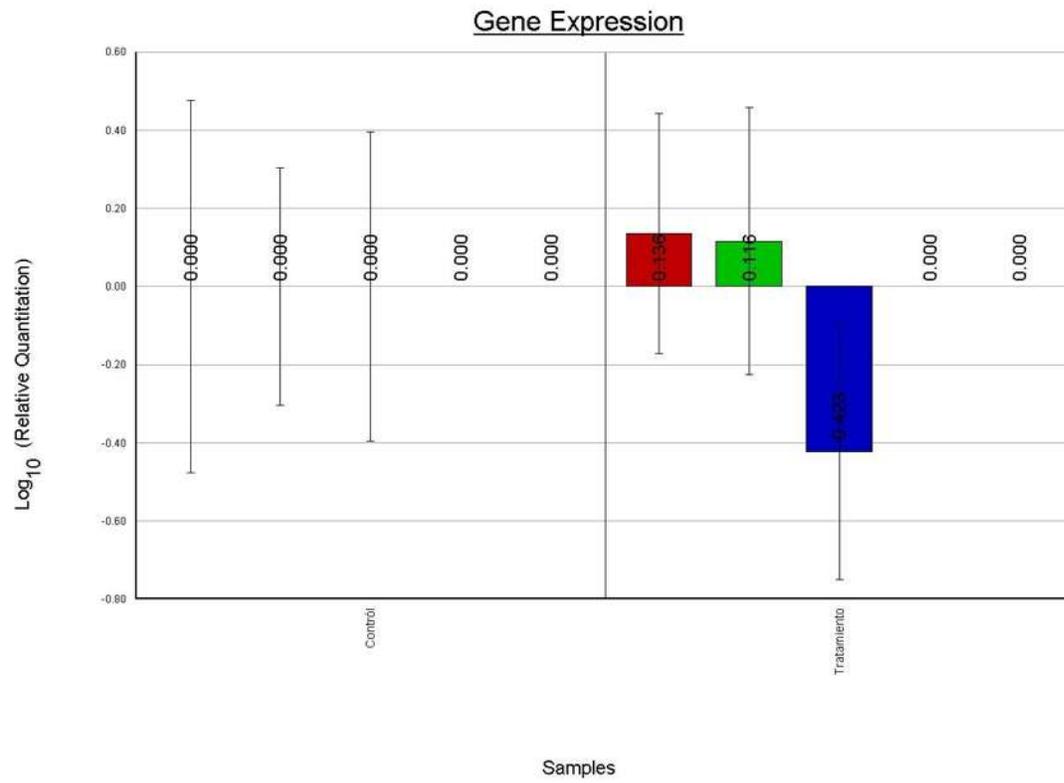
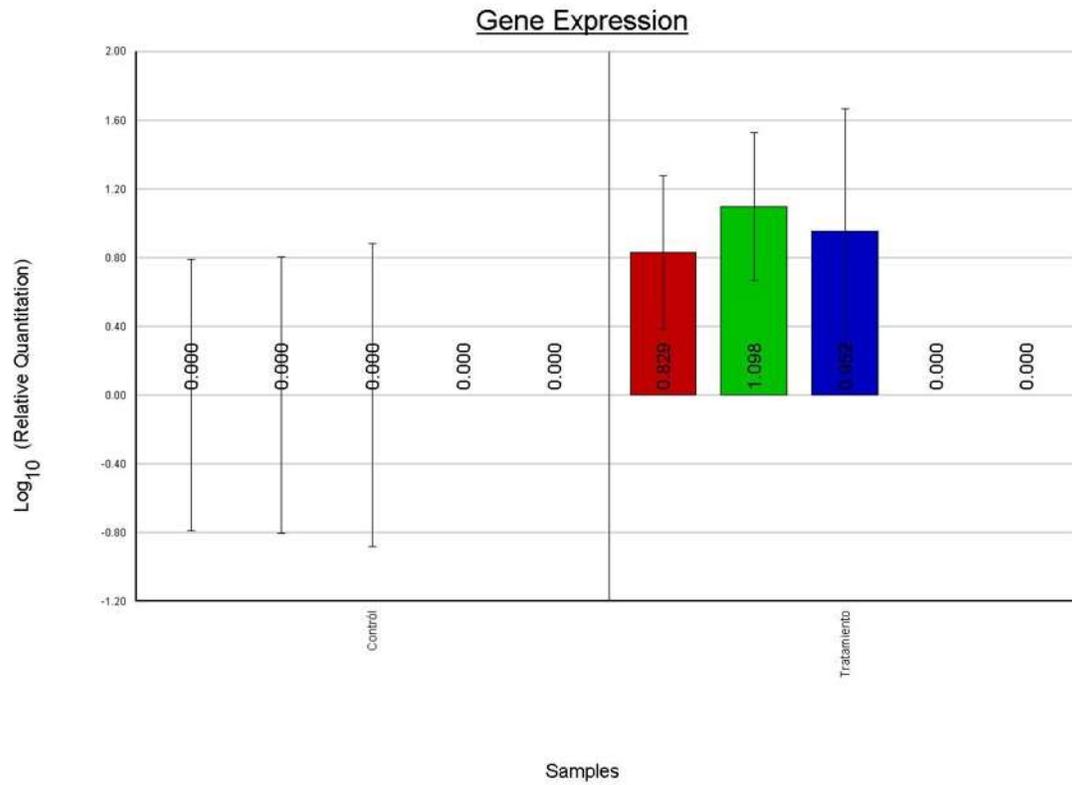


Figura 22. Expresión relativa en hojas del ensayo 1 (Día 10). En rojo, verde y azul los genes *ltp*, *thi* y *hscp80* respectivamente. Barras de error como error estándar.



Document: Análisis de hojas 02may2010 (ddCt Study)

Figura 23. Expresión relativa en hojas del ensayo 1 (Día 15). En rojo, verde y azul los genes *ltp*, *thi* y *hscp80* respectivamente. Barras de error como error estándar.

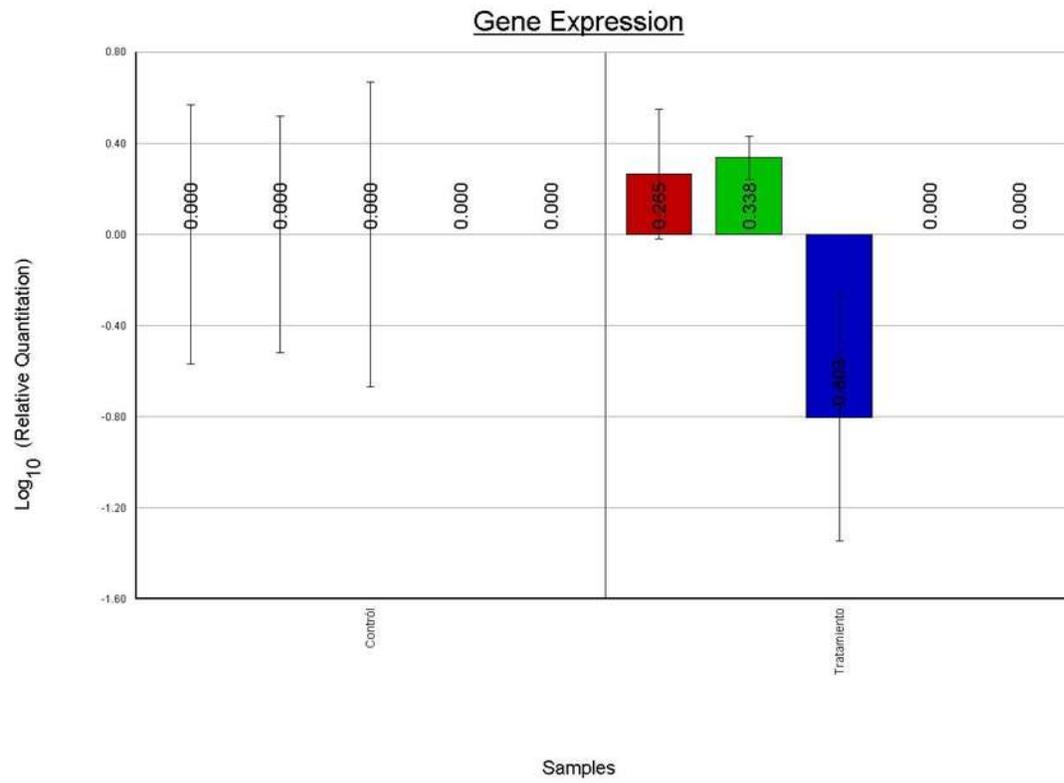


Figura 24. Expresión relativa en raíces del ensayo 2 (Día 1). En rojo, verde y azul los genes *ltp*, *thi* y *hscp80* respectivamente. Barras de error como error estándar.

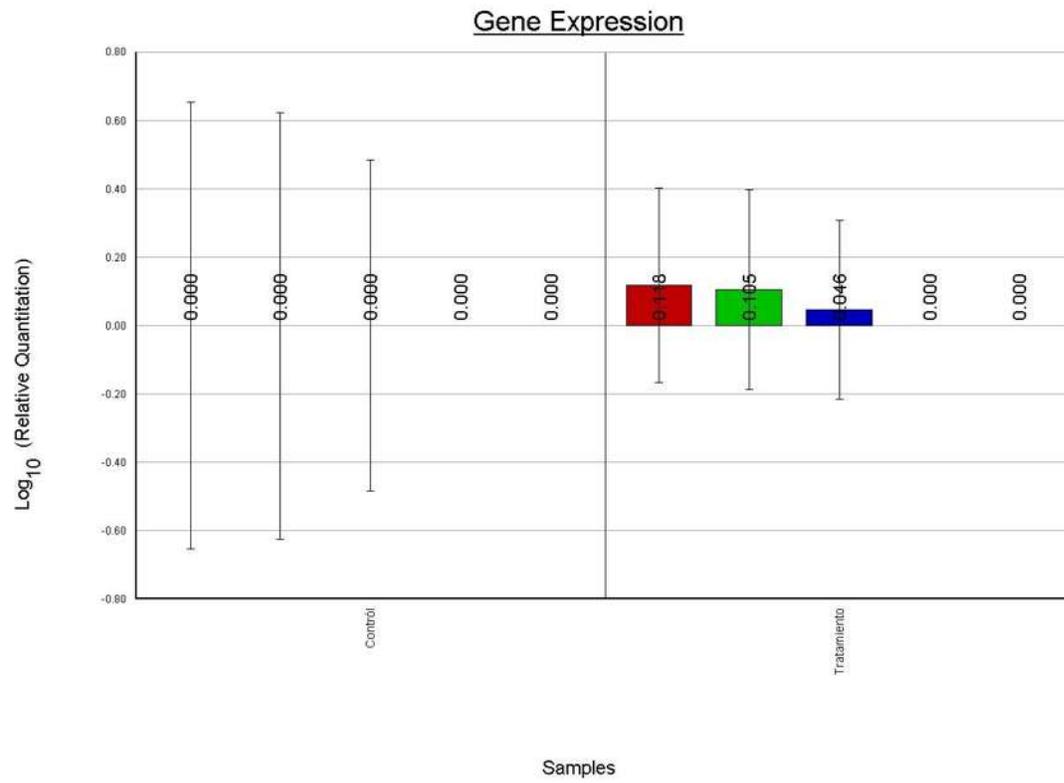


Figura 25. Expresión relativa en raíces del ensayo 2 (Día 10), En rojo, verde y azul los genes *ltp*, *thi* y *hscp80* respectivamente. Barras de error como error estándar.

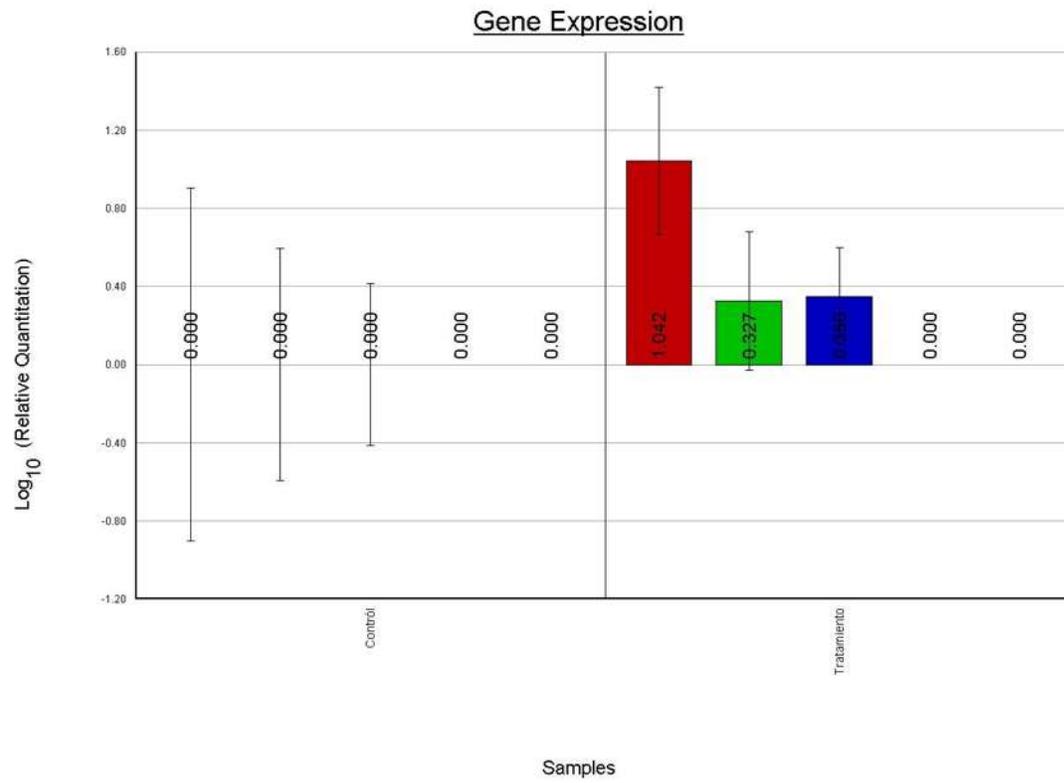


Figura 26. Expresión relativa en raíces del ensayo 2 (Día 13), En rojo, verde y azul los genes *ltp*, *thi* y *hscp80* respectivamente. Barras de error como error estándar.