



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

Centro de Ciencias Básicas

**Identificación y estudios de expresión de algunos genes inducidos por salinidad en
Suaeda edulis de un cráter salino del centro de México.**

T E S I S QUE PRESENTA:

Gloria Viviana Cerrillo Rojas

PARA OBTENER EL GRADO DE:

Doctorado en Ciencias Biológicas

Tutor:

Dr. José Francisco Morales Domínguez

Co-Tutor:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra

Asesor:

Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch

Aguascalientes, Ags., Mayo 2020

NOMBRE: GLORIA VIVIANA CERRILLO ROJAS ID 216144

PROGRAMA: DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS LGAC (del posgrado): BIOTECNOLOGÍA Y BIOQUÍMICA ANIMAL Y VEGETAL

TIPO DE TRABAJO: Tesis Trabajo práctico
IDENTIFICACION Y ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE ALGUNOS GENES INDUCIDOS POR SALINIDAD EN *Suaeda edulis* DE UN CARÁCTER SALINO DEL CENTRO DE MÉXICO

TÍTULO: _____
IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): _____

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- SI El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SI Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- SI Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
SI Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI Coincide con el título y objetivo registrado
SI Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- SI Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
SI El estudiante es el primer autor
SI El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
SI En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
SI Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
SI La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Si X

No _____

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DR. FIDEL GUEVARA LARA

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DRA. ALMA LILIAN GUERRERO BARRERA

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DRA. HAYDÉE MARTÍNEZ RUVALCABA

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

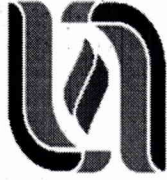
M. EN C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.

Revisado por: D. Control Escolar



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente, tengo a bien informarle que la **M. en C. GLORIA VIVIANA CERRILLO ROJAS** con ID 216144, estudiante del Doctorado en Ciencias Biológicas ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de redacción, revisión y correcciones de su tesis titulada **identificación y estudios de expresión de algunos genes inducidos por salinidad en *Suaeda edulis* de un cráter salino del centro de México.**

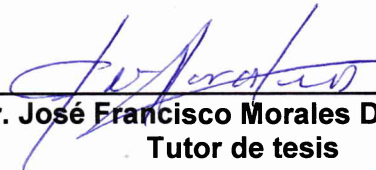
Por lo anteriormente mencionado y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO** para la impresión del documento y continuar con el proceso de titulación y programación del examen de grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags. a 18 de marzo de 2020



Dr. José Francisco Morales Domínguez
Tutor de tesis

c.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente, tengo a bien informarle que la **M. en C. GLORIA VIVIANA CERRILLO ROJAS** con ID 216144, estudiante del Doctorado en Ciencias Biológicas ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de redacción, revisión y correcciones de su tesis titulada **identificación y estudios de expresión de algunos genes inducidos por salinidad en *Suaeda edulis* de un cráter salino del centro de México.**

Por lo anteriormente mencionado y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO** para la impresión del documento y continuar con el proceso de titulación y programación del examen de grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

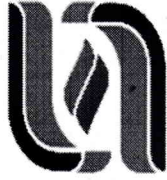
ATENTAMENTE

“SE LUMEN PROFERRE”

Aguascalientes, Ags. a 18 de marzo de 2020

Dra. Ruth Elena Soria Guerra
Cotutora de tesis

c.c.p. Archivo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

M. en C. JORGE MARTÍN ALFÉREZ CHÁVEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio del presente, tengo a bien informarle que la **M. en C. GLORIA VIVIANA CERRILLO ROJAS** con ID 216144, estudiante del Doctorado en Ciencias Biológicas ha cumplido de manera satisfactoria el proceso de redacción, revisión y correcciones de su tesis titulada **identificación y estudios de expresión de algunos genes inducidos por salinidad en *Suaeda edulis* de un cráter salino del centro de México.**

Por lo anteriormente mencionado y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO** para la impresión del documento y continuar con el proceso de titulación y programación del examen de grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"SE LUMEN PROFERRE"

Aguascalientes, Ags. a 18 de marzo de 2020

Dr. Eugenio Pérez Molphe-Balch
Asesor de tesis

***In Vitro* Propagation, Isolation and Expression Studies of *Suaeda edulis* Genes Involved in the Osmoprotectants Biosynthesis**

Gloria Viviana Cerrillo-Rojas¹, Mariana Tiscareño-Andrade¹, Ana Erika Ochoa-Alfaro², Eugenio Pérez-Molphe Balch¹, Ruth Elena Soria-Guerra² and José Francisco Morales-Domínguez^{1,*}

¹Departamento de Química, Universidad Autónoma de Aguascalientes, Centro de Ciencias Básicas, Ciudad Universitaria, Aguascalientes, 20131, México

²Facultad de Química, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Zona Universitaria, San Luis Potosí, 78210, México

*Corresponding Author: José Francisco Morales-Domínguez. Email: jfmoral@correo.uaa.mx

Received: 20 January 2020; Accepted: 20 February 2020

Abstract: Halophytes are an excellent choice for the study of genes conferring salt tolerance to salt-sensitive plants and, they are suitable for reclamation and remediation of saline soil. We develop an in vitro plant propagation protocol and studies of genes involved with GB and Pro biosynthesis in *Suaeda edulis*. Axillary buds were used as explants and cultured in different treatments on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with different concentrations and combinations of plant growth regulators. The highest number of multiple shoots was on MS medium containing 1 mg/L Benzyladenine (BA) and / or 2 g/L activated carbon with 5.5 ± 06 shoots per explant. The identification and expression analysis of genes involved in glycine betaine (GB) biosynthesis were S-adenosylmethionine synthetase (*SAMS*), choline monooxygenase (*CMO*) and betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*), and for proline (Pro) was pyrroline 5-carboxylate synthetase (*P5CS*). These sequences shared 90–95% of identity with others plant homologous in public databases. The amino acids sequence analysis showed that all these peptides contain some of the conserved motifs of those kinds of enzymes. The qRT-PCR analysis revealed a higher expression of *SeBADH*, *SeCMO*, and, *SeP5CS* genes in the roots and leaves from plants collected in the field as well as from in vitro plants. However, the expression level of *SeSAMS* was higher only in the leaves of plants collected in the field when compared to those cultivated in vitro.

Keywords: Axillary buds; halophyte; proline; glycine betaine; salt-resistant

1 Introduction

The high soil salinity can cause in plants: a) osmotic unbalance, b) ionic toxicity, c) alterations in the membrane composition and d) structure and photosynthesis disruption. To overcome the harmful effects of osmotic stress, some plants can make modifications in their physiology and anatomy including a succession of mechanisms that maintain or restore the adequate metabolic activity of the plant; among these mechanisms are the osmoprotectant biosynthesis such as GB and Pro [1–3].



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

The GB and Pro biosynthesis is well established. For GB biosynthesis, cytoplasmic and chloroplast enzymes participate: first, the S-adenosylmethionine synthetase (SAMS) adds a methyl group to phosphoethanolamine compounds to synthesize choline, then the choline is transported to the chloroplast where the choline monooxygenase (CMO) enzyme acts to synthesize betaine aldehyde, and finally it is converted to GB by the betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) [4]. Several studies of genes involved in the GB and Pro synthesis have been carried out in the genus *Suaeda* under conditions of salt stress: for example, *SAMS*, *CMO* and *BADH*, which have been analyzed in different species of *Suaeda* such as *S. maritima* [4], *S. salsa* [5], *S. fruticosa* [6] and *S. glauca* [7].

There are two enzymes that act in Pro biosynthesis, the first is pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS), which takes glutamate as a substrate and converts into glutamate semialdehyde, which is transformed to pyrroline-5-carboxylate by spontaneous cyclization, and then the second enzyme, pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) converts to Pro [8], however, it has been shown that the enzyme P5CS is the rate-limiting enzyme and is feedback-inhibited by proline [9]. These processes of salinity tolerance are carried out principally by halophyte plants [1,10] among which are those of the genus *Suaeda* Forssk. ex Scop., which include more than 110 species, usually growing in humid saline or alkaline zones, and they can be bushes or sub-shrubs, upright or prostrate, annual or perennial. One of the species of this genus is *S. edulis*, a plant of 15–110 cm high, halophyte, strictly annual, and distributed in saline-alkaline soils of the central region of Mexico. Phylogenetic studies with several *Suaeda* species, based on molecular markers of the nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) and the chloroplast rpl32-trnL intergenic, confirmed that *S. edulis* is found only in the central region of Mexico [11–13].

Since halophytes are a good source to study of the genes that conferring salt tolerance to salt-sensitive plants, then they are suitable for reclamation and remediation of saline soils [10,14]. Therefore, in this work was implemented an efficient *in vitro* protocol to *S. edulis*, to conserve the species, and as material for expression studies of *SAMS*, *BADH*, *CMO*, and *P5CS* genes. These genes closely related to salt resistance were analyzed by qRT-PCR.

2 Material and Methods

2.1 *In vitro* Propagation

Samples of 10 cm sections of plants were collected from saline-alkaline soil [12] with ECe of 4.2 dS m⁻¹, pH of 9.2 and corresponding also with a primary type salinity; in according with the most widely accepted definition (FAO 1997), a saline soil is that has an electrical conductivity of the saturation extract (ECe) of 4 dS m⁻¹. The vegetal material was transferred in coolers to the laboratory, then rinsed twice with sterile water and washed carefully with benzalkonium chloride 1% (Antibenzil®). The internodal regions with axillary buds were used as explants for *in vitro* propagation. These explants were disinfected under axenic conditions as follows: 10 min in a solution of 20% Tween and 10% Antibenzil®; 30 s in a solution of 50% ethanol; and 10 min in a solution of 0.35% colloidal silver (Mycrodin®), and 1% sodium hypochlorite, rinsed for 1 min with sterile distilled water between each solution. Once the explants were disinfected, they placed in glass containers with 20 mL basal medium MS [15]. Ten explants per bottle were placed with three repetitions each one. The treatments were the following: 1) MS medium, 2) MS at pH 8.0, 3) MS with CaCl₂ 0.66 g/L, 4) MS with Benzyladenine (BA) 1 mg/mL at pH 8.0, 5) MS plus activated charcoal 2 g/L of, and 6) MS plus BA 1 mg/mL. They were incubated at 25°C and in the light (16 h light/8 h dark). The explants with the best response were established on MS without plant growth regulators (PGRs) for rooting. The response data of the explants to the different treatments were taken at 15 d and 30 d. Roots and leaves taken from this material were subsequently used to perform the expression analyses of the genes of interest. The results were compared by variance analysis (ANOVA) followed by the Tukey test. A value of $p < 0.05$ was considered significant statistically.

2.2 DNA Extraction and PCR Amplification

The extraction of DNA was carried out as was previously described [16]. Specific oligonucleotides were designed with DNAMAN program [<http://www.lynnon.com/dnaman.html>] for each of the genes starting from conserved regions corresponding to *Suaeda* species and genera of the Chenopodiaceae and Amaranthaceae family previously reported in the NCBI website [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>].

The oligonucleotides used were: fSAMS 5-CATGCACTAAGACTAACATGGTC-3 and rSAMS 5-GATGACGGGCTTGATGACA-3; fBADH 5-TCTCAGGCAGCCTATTGGTGT-3 and rBAHD 5-CACTCTTTGCTGTGCATATGTAC-3; fCMO 5-AGAAGTGAATTCCCCATGGAAT-3 and rCMO 5-TTCTCAATTGGCATCACATATCT-3; fP5CS 5-CAGTTTGGATATGGCGAAGCAGAT-3 and rP5CS 5-GAGCAAACCCAACCCACGAC-3;

For the gene amplification, GoTaq[®] Flexi DNA Polymerase (Promega Corp.) commercial kit was used along with 10 ng of DNA, 0.4 mM of each oligonucleotide and 0.2 mM of each dNTP, in a final volume of 25 μ l. The amplification conditions were: initial denaturation at 94°C for 2 min followed by 35 cycles of 94°C for 1 min, 52–58°C for 1 min and 72°C for 1 min, ending with a final extension at 75°C for 5 min.

2.3 Bioinformatic Analysis

The partial sequences of *SAMS*, *BADH*, *CMO*, and *P5CS* of *S. edulis* were subjected to a bioinformatics analysis starting with the search of homologous sequences in the NCBI database using the basic local alignment search tool (BLAST) algorithm [<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>]. The deduced amino acid sequences were obtained by “Translate tool” from ExPASy Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/>). The search for the conserved domains was done through the NCBI’s Conserved Domain Architecture Retrieval Tool (CDART) platform [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi>].

The hypothetical structural modeling of the amino acid sequences was carried out through two programs: 1) CPHModels-3.2 [<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>] to obtain the PDB file and 2) the Chimera 1.8 program [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>] to obtain the three-dimensional model. Phylogenetic analyses were carried out with MEGA7 software by the Neighbor-Joining method, and the evolutionary distances were computed using the Dayhoff matrix-based method. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (1000 replicates) was placed next to the branches.

2.4 RNA Extraction and qRT-PCR

Roots and leaves taken from the crater plants and from *in vitro* plants were frozen and macerated separately in liquid nitrogen, then the total RNA was extracted using the PureLink[®] Plant RNA Reagent kit (Ambion Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). The total RNA (1 μ g) extracted from each sample was reverse transcribed to cDNA following the SuperScript[™] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) protocol. The cDNA concentration was adjusted to 100 ng μ l⁻¹ using a Nanodrop Spectrophotometer (Thermo Scientific).

For real-time quantitative reverse transcriptional PCR (qRT-PCR), primers oligonucleotides were designed from specific sequences of each gene obtained of *S. edulis*: fSeSAMS 5-AGGTAAGGAAGAATGGCACTTGT-3 and rSeSAMS 5-GAGACTGTGACCAACGATCAAAT-3; fSeBADH 5-GCAGAAGCTCTGGACAACAAGC-3 and rSeBADH 5-AGCTGTACTTAAGCCATCCGAG-3; fSeCMO 5-GCCGAGATGGTGAAGGAAAA-3 and rSeCMO 5-AGCCACCCAAACAACACTGATG-3; fSeP5CS 5-GCGTTGGCAGTCATTCTTTT-3 and rSeP5CS 5-GATGTTTCATGCTGCCATTGA-3; To normalize the relative quantification, the β -tubulin gene was used through the primers: fTub 5-CCTTATTCCATTCCCCAGGCTTC-3 and rTub 5-GCACAAAGGAGGTTGATGAGCAGATG-3 [17], the obtained sequence in *S. edulis* was named *SeTUB*.

Amplification reactions were carried out in 96-well plates in a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Each RT-PCR reaction contained 10 µl SYBR Green I Master Mix, 100 ng of cDNA and 0.5 pM of forward and reverse primers in a final volume of 20 µl. The program parameters for amplification were 50°C 2 min, 95°C 10 min, 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Melting curves were generated by a cycle of 95°C during 15 s, 60°C during 1 min and 95°C during 30 s. The data were analyzed using the Applied Biosystems StepOne™ Real-Time PCR System Software (Applied Biosystems, Mulgrave, AUS).

2.5 Statistical Analysis

The qRT-PCR was performed with two biological replicas to increase the trustworthiness of gene expression analysis. For each biological replica the samples were evaluated in triplicate. To detect differences in the relative quantification of each gene, a single factor analysis of variance (ANOVA) was performed. The significance of the differences between each value obtained was determined by the Tukey test. Differences with $p \geq 0.05$ were considered significant, and all analyses performed with the Minitab v16 software (State College, PA, USA).

3 Results and Discussion

3.1 In vitro Propagation

The explants response in culture medium was different among treatments. For example, in treatment 1, 95% of explants survived but with slow growth and some necrotic leaves (Fig. 1a). In treatment 2, 96% of the explants showed thickness in the stem with few leaves and in 30 d 100% of the plants were necrotic, etiolated and died (Fig. 1b). In treatment 3, after 15 d the seedlings showed more growth; however, the leaves began to etiolate (Fig. 1c) and at 30 d 95% died. In treatment 4, all explants came to have small leaves but later they were etiolated (Fig. 1d) and 30 d later 97% of them died. In treatments 2 to 4, an attempt was made to have an in vitro environment with some characteristics of the natural habitat of the plant as a high pH and high concentration of CaCl₂; however, all explants under these conditions died. At this respect, it is known, that most in vitro plants can tolerate pH ranges of 4.2 to 7.2 and that above pH 8 they die [18].

On the other hand, in treatments 4, 5 and 6 the effect of BA was analyzed because it is the cytokinin that has been most used in tissue culture for the proliferation of many plants [19]. In treatments 5 and 6; 5.5 (± 06) shoots per explant were generated (Figs. 1e and 1f) and after 30 d they were transferred to MS medium without PGR and greater proliferation of shoots, and root was shown (Figs. 1g and 1h). However, with a combination of BA and pH 8, the plants died (treatment 4). In treatment 5, which contained activated charcoal, greater sprouting, and even root generation was observed; regarding this result, that one of the effects of activated charcoal is the irreversible adsorption of inhibitory compounds in the culture medium and decreases in the amount of toxic metabolites and phenolic exudation, in addition to releasing natural substances that promote growth, alteration and darkening of the culture media and absorption of vitamins, metals, ions and plant growth regulators [20].

As far as the authors know, there are no reports in the literature about *S. edulis* in vitro propagation. Therefore, this report presents a simple and rapid protocol for seedling micropropagation, demonstrating that it is not necessary to combine others PGRs to induce a large number of buds or to use other means for rooting. *S. edulis* establishment allowed us to compare the behavior of genes associated with salinity in plants growing in vitro with plants growing in saline soil.

3.2 Bioinformatics Analysis

GB is present in almost all kingdoms and confers resistance against abiotic stress such as salinity, drought, and cold. In higher plants, GB is synthesized in two oxidative enzymatic steps of choline,

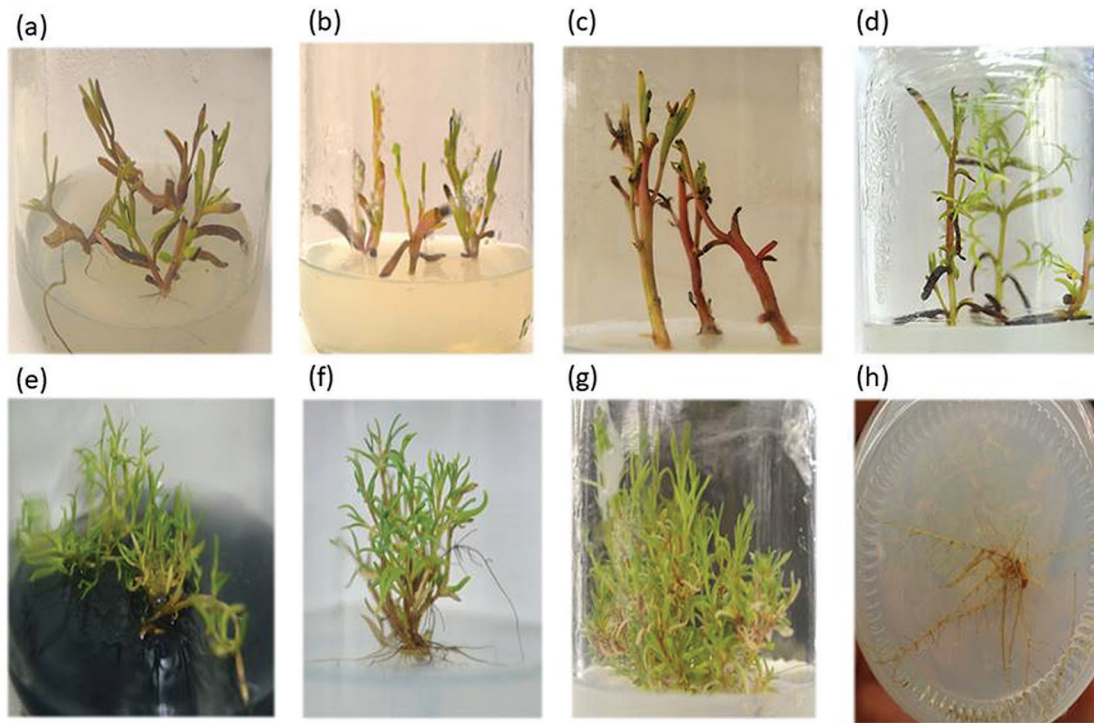


Figure 1: *In vitro* propagation of *S. edulis* process. In all the treatments, MS was used as a basal medium. (a-f) Seedlings at fifteen days, (a) seedlings in treatment 1; MS medium (b) seedlings in treatment 2; MS pH 8. 0, (c) seedlings in treatment 3; MS pH 8 plus BA 1 mg/ml, (d) seedlings in treatment 4; MS plus CaCl₂, (e) seedlings in treatment 5; MS plus activated carbon, (f) seedlings in treatment 6; MS plus BA 1 mg/ml, (g) seedlings from treatments 5 and 6 in MS after 30 days, (h) seedling roots in MS medium

catalyzed by CMO and BADH, respectively [4,21]. Generally, the gene studies for GB synthesis begins with CMO. However, in this work was decided to start with the gene that codes for SAMS, since this enzyme catalyzes the formation of S-adenosyl methionine (SAM) and is a critical molecule for different metabolic processes such as DNA methylation, ethylene, polyamides, proteins, and lipids synthesis, and also plays a crucial role in the protection of plants against various abiotic stresses [22,23].

The corresponding sequences for these genes identified in *S. edulis* were named *SeSAMS*, *SeBADH*, *SeCMO*, and *SeP5CS*. Sequence analysis revealed that *SeSAMS* was 470 bp. It was deduced to encode a 153 amino acids polypeptide and showed a 97% similarity with *Suaeda salsa* and 91% with *Malus domestica*. Besides, *SeSAMS* sequence contains the central conserved (GAGDQG) SAMS motifs (Fig. 2a) that are presents in all plant SAMS; the protein sequence of SAMS has three conserved motifs: 1) the methionine binding GHPDK is at the amino terminus, 2) GAGDQG is at the central ATP-binding, and 3) is GGGAFSGK, which forms a P-loop for the phosphate-binding region [24]. The evolutionary history of the protein shows an important closeness with SAMS from *S. salsa* (Fig. 2b). To predict *SeSAMS* tertiary structure, we constructed a comparative model of its three-dimensional structure using Chimera software, which shows the GAGDQG domain and its splice with 4KTT (Fig. 2c).

For *SeCMO*, was obtained a fragment of 456 bp, and the putative translatable region was 152 amino acids (Fig. 3a). *SeCMO* showed 100% similarity to CMO of *Suaeda maritima* and *Suaeda liaotungensis* and 88 % to *Salicornia europaea*. The phylogenetic analyses showed that the deduced amino acids

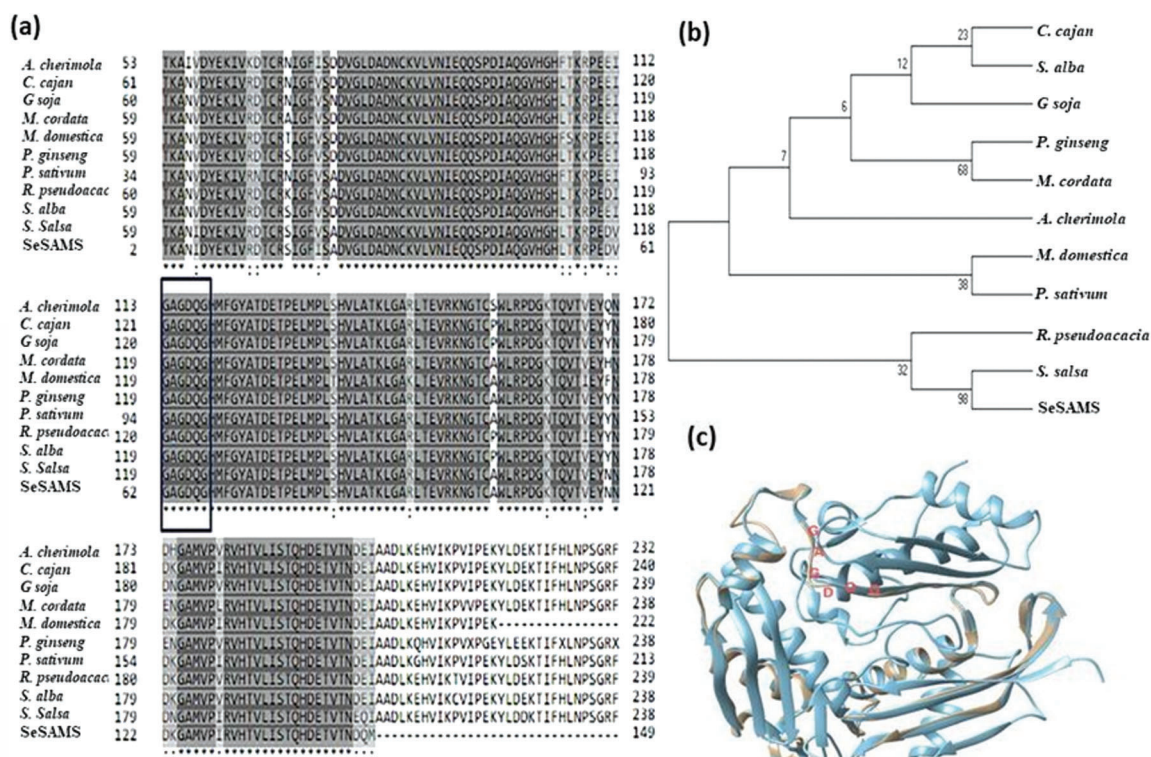


Figure 2: Alignment, evolutionary history, and hypothetical structural modeling of *SeSAMS*. (a), *SeSAMS* with SAMS from *Annona cherimola* ABC24692.1, *Cajanus cajan* AEY85025.1, *Glycine soja* KHN28175.1, *Macleaya cordata* OVA13537.1, *Malus domestica* BAI66450.1, *Panax ginseng* ACD92982.1, *Pisum sativum* AAA58772.1, *Robinia pseudoacacia* AIT39705.1 *Sonneratia alba* AGJ71754.1 and *Suaeda salsa* AAG42490.1; the amino acid residues conserved in all sequences are shown by asterisks, and conservative substitutions are shown by dots (residues that are associated with the putative ATP-binding site are shown by a box). (b), Evolutionary relationships of *SeSAMS* with taxa, inferred using the Neighbor-Joining method with MEGA7. The optimal tree with the sum of branch length = 0.25799755 is shown. (c), ProB domine in *SeSAMS* and its splice with chain B from transferase 4KTT

sequence protein was closely with the CMO of *S. liaotungensis*, although it also showed evolutionary closeness to *S. maritima* (Fig. 3b). *SeCMO* has conserved putative motif (G/DX3-4DX2HX4-5 H) for the coordination of mononuclear non-heme Fe. Multiple alignments of several CMO and CMO-like proteins present two conserved motifs, 1) for the coordination of the Rieske-type [2Fe-2S] cluster CXHX15-17 CXH EI, and 2) for the coordination of mononuclear non-heme Fe, G/DXDX2HX4-52 H [25]. The comparative model constructed to predict the three-dimensional structure of *SeCMO* and its splice with chain A from oxidoreductase IWQL are shown in Fig. 3c, highlighting the CESVQKGLE conserved region located in the ring hydroxylating alpha subunit (catalytic domain).

For *SeBADH* we obtained a fragment of 252 bp, and the translatable region is 84 amino acids and contains part of the aldehyde dehydrogenase (ALDH) domain, characteristic of the ALDH superfamily (Fig. 4a). The sequence showed a 91% similarity with BADH of *Suaeda glauca* and *S. liaotungensis* and 77% with *Spinacia oleracea*. Its evolutionary history indicated that *SeBADH* is a unique subgroup with the BADH of *S. liaotungensis*, although it also showed closeness with that of *S. glauca* (Fig. 4b). The

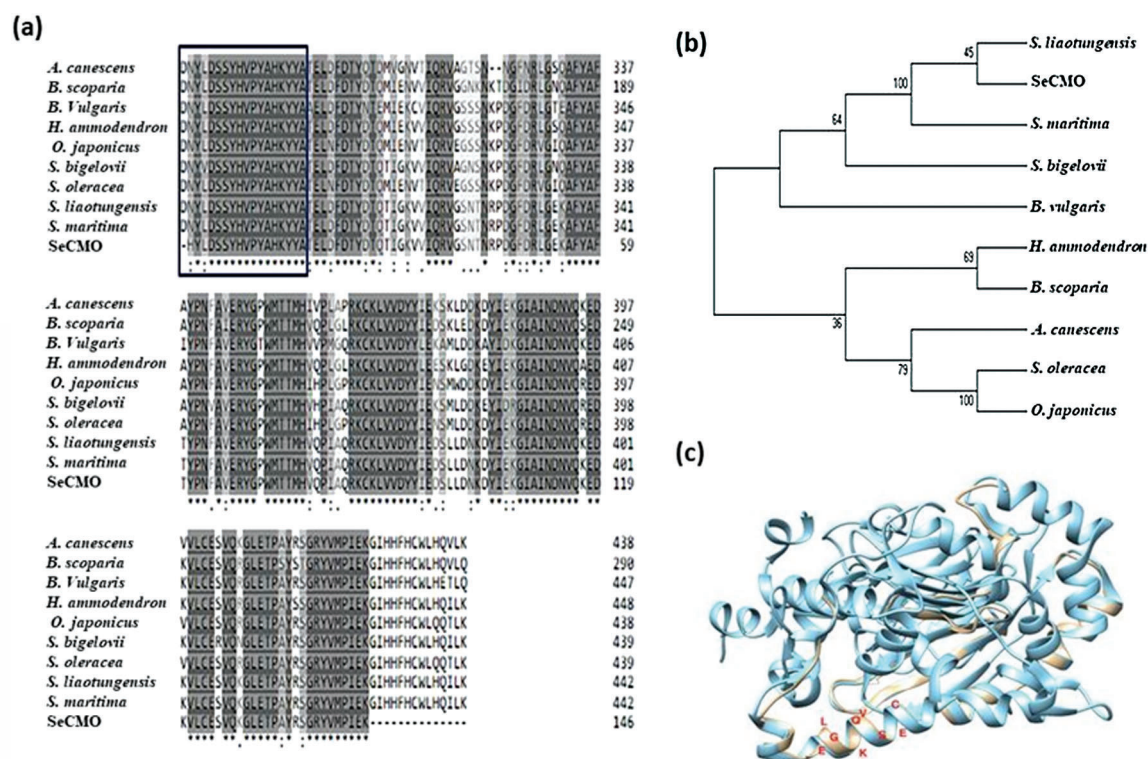


Figure 3: Alignment, evolutionary history, and hypothetical structural modeling of SeCMO. (a), SeCMO with CMO from *Atriplex canescens* AFG28558.1, *Bassia scoparia* AAQ92313.1, *Beta vulgaris* BAE07177.2, *Haloxylon ammodendron* ACX47904.1, *Ophiopogon japonicus* ABG34274.1, *Salicornia bigelovii* AJF98574.1, *Spinacia oleracea* ABN43460.1, *Suaeda liaotungensis* AAM43920.1 and *Suaeda maritima* AFW04225.1; the amino acid residues conserved in all sequences are shown by asterisks, and conservative substitutions are shown by dots. The putative consensus sequence for the coordination of mononuclear non-heme Fe (G/DX3–4DX2HX4–5 H) is shown by a box. (b), Evolutionary relationships of SeCMO with taxa, inferred using the Neighbor-Joining method with MEGA7. The optimal tree with the sum of branch length = 0.54709925 is shown. (c), SeCMO and its splice with chain A from IWQL oxidoreductase; both of them show the CESVQKGLE conserved region located in the ring hydroxylating alpha subunit (catalytic domain)

three-dimensional tertiary structure of SeBADH and its splicing with chain c from betaine aldehyde dehydrogenase 5A2D show the ALDH domain (Fig. 4c). Regarding the SeBADH fragment, its sequence was very short, and although it does not include the VTLELGGKSP decapeptide characteristic of these enzymes, it does have the highly conserved ALDH domain in this type of enzymes, and its evolutionary history grouped it in a clade that includes the BADH of *S. liaotungensis* (Fig. 4b).

The $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) and pyrroline-5-carboxylate reductase (P5CR) enzymes are involved in the glutamate pathway to produce proline, and studies have shown that this route is active when plants are under different types of environmental stress [8,9].

For *SeP5CS*, was obtained a fragment of 786 nucleotides, and encoding to predicted 262 amino acids polypeptide. *SeP5CS* showed a 69% similarity to the P5CS of *Suaeda salsa* and 61% to *Beta vulgaris*. The P5CS enzymes contain a glutamate 5-kinase (γ -GK) region corresponding to proB and followed by a gamma-glutamyl phosphate reductase (γ -PR) region corresponding to proA. *SeP5CS* only shows a part of

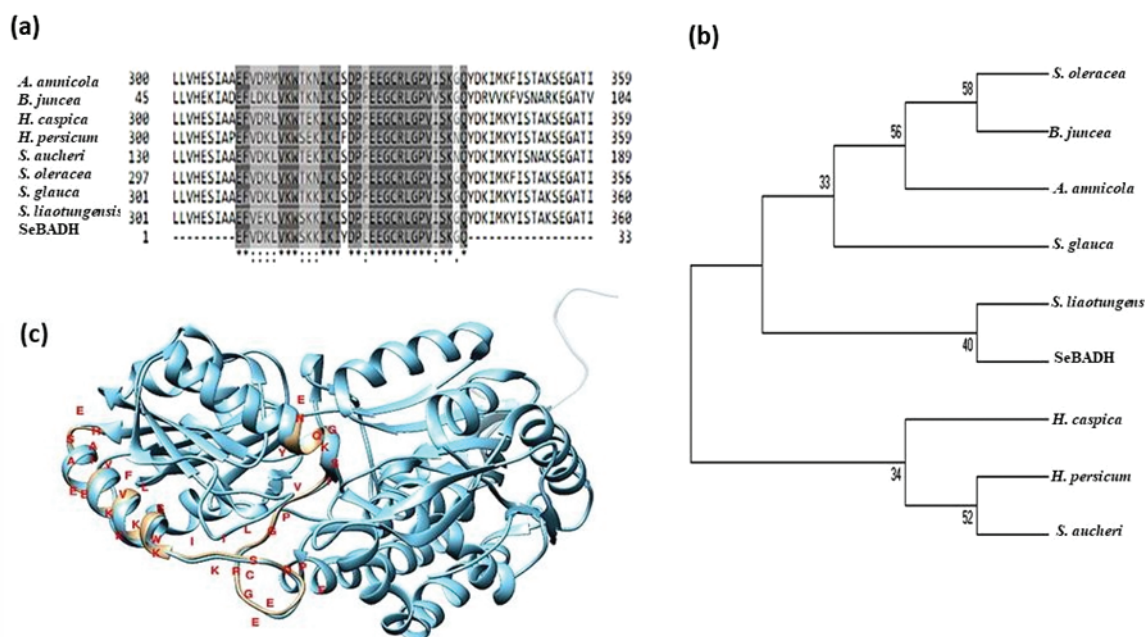


Figure 4: Alignment, evolutionary history, and hypothetical structural modeling of *SeBADH*. (a), *SeBADH* alignment with *BADH* from *Atriplex amnicola* AHH24263, *Brassica juncea* AEX55691.1, *Halostachys caspica* ABO45931.1, *Haloxylon persicum* AEW31327.1, *Salsola aucheri* AWK59869.1, *Spinacia oleracea* AAN52929.1, *Suaeda glauca* AHB08884.1 and *Suaeda liaotungensis* AAL33906.1; the amino acid residues conserved in all sequences are shown by asterisks, and conservative substitutions are shown by dots. (b), Evolutionary relationships of *SeBADH* with taxa, inferred using the Neighbor-Joining method with MEGA7. The optimal tree with the sum of branch length = 0.85537383 is shown. (c), ALDH-SF domine in *SeBADH* and its splice with chain c from 5A2D *BADH*

the glutamate 5-kinase domain (PLN02418), representative of delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase (Fig. 5a). The phylogenetic tree shows *SeP5CS* sub-grouped only with the *P5CS* from *S. salsa* (Fig. 5b). The three-dimensional comparative model of *SeP5CS* and its splice with the *P5CS* template 2H5G also show conserved amino acids (Fig. 5c)

3.3 Expression Analysis

In some studies, with *Suaeda* sp., the gene expression associated with saline stress is analyzed only in germinated seeds or plants grown in the laboratory stimulated with different concentrations of NaCl [26]. However, no study has shown gene expression in their natural habitat. In this study, was analyzed the expression of the *SeSAMS*, *SeCMO*, *SeBADH* and *SeP5CS* genes in different organs of *S. edulis* grown in its natural habitat (crater), since the soil has a pH 9.2 and a high concentration of sodium and salts, and compare it with that of seedlings grown in vitro (pH 5.7).

The real-time expression results showed that in leaves from crater plants, the expression levels of *SeSAMS*, *SeBADH*, and *SeCMO* are higher than in vitro plants (Fig. 6). Similar results were found for *BADH* and *SAMS* from *Suaeda salsa* [5] and *Suaeda aegyptiaca* [27], and *CMO* with *Solanum lycopersicum* [28] suggesting that GB could be synthesized mainly in the foliage and that *SAMS* transcription levels which are co-regulated with those of *BADH* and *CMO*. It has been observed that *BADH* high expression is associated with an increase in enzyme activity in response to salinity. Also, it has been observed that, in the genus *Suaeda* treated with NaCl, there is overexpression of genes involved

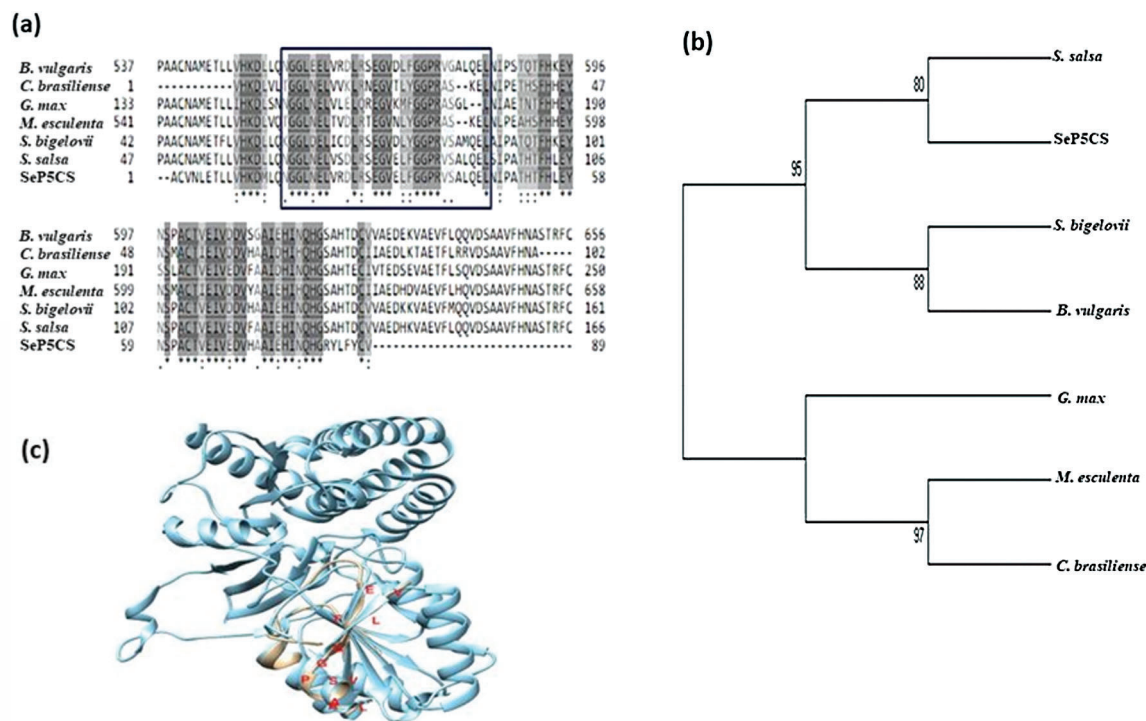


Figure 5: Alignment, evolutionary history, and hypothetical structural modeling of SeP5CS. (a), SeP5CS with P5CS from *Beta vulgaris* AQZ26218.1, *Calophyllum brasiliense* AHN15384.1, *Glycine max* CAG29643.1, *Manihot esculenta* ANU05021.1, *Salicornia bigelovii* AGN48983.1 and *Suaeda salsa* AAM28630.1; the amino acid residues conserved in all sequences are shown by asterisks, and conservative substitutions are shown by dots. The putative Leu domain is shown by a box. (b), Evolutionary relationships of SeP5CS with taxa, inferred using the Neighbor-Joining method with MEGA7. The optimal tree with the sum of branch length = 0.25799755 is shown. (c), ProB regions in SeP5CS and its splice with P5CS, 2H5G mold

in GB synthesis; for example, was found *CMO* overexpression in the shoot from *S. salsa* with NaCl 400 mM [5]. Similarly, Kuttan et al. [29] working with *S. maritima* seedlings treated with NaCl 200 mM observed *SAMS* overexpression concluding that GB accumulation is a response to salinity. These authors explain that *CMO* overexpression under saline conditions is essential in this plant for GB high accumulation in the tissue due to they noted that *BADH* expression is much lower than that *CMO* expression; however in this work, there was not a significant difference between both of them.

In addition to GB, another important osmoprotectant is Pro, and it is known that P5CS is the limiting enzyme in its synthesis [8,9]. In this study, *SeP5CS* expression levels were significantly higher in the roots and leaves from crater than in vitro plants (Fig. 6). Wei et al. also detected *P5CS* overexpression in roots and leaves from *Lilium regale* stimulated with 250 mM NaCl, and observed Pro accumulation, grew better in root and salinity tolerance [30]. It has also been suggested that synthesis of Pro in roots seems to be an essential parameter to halophytes differentiation, since its production in salinity tolerant plants starts with ionic stress. Under these conditions, the Pro concentrations reach higher levels than in susceptible plants [1,3,8].

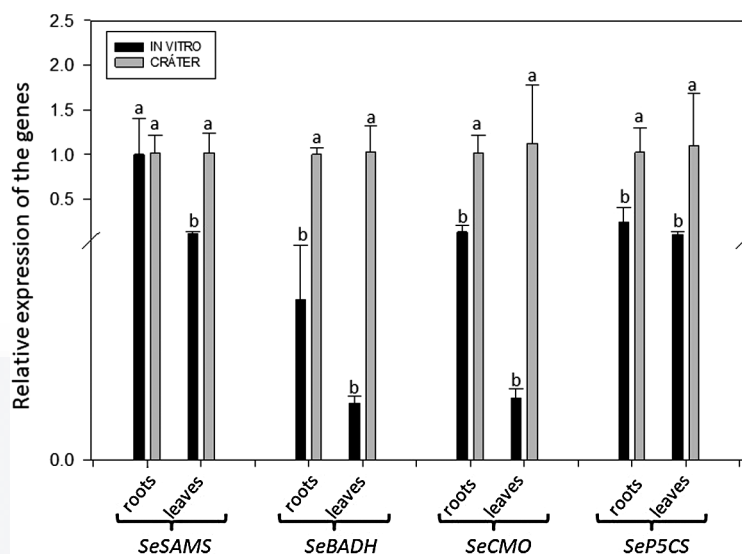


Figure 6: Quantitative RT-PCR of *SeSAMS*, *SeBADH*, *SeCMO*, *SeP5CS*, and *SeVP* in *S. edulis*. Black bars indicate the response of roots and leaves from *in vitro* culture plants, and gray bars show the response of roots and leaves from the field plants. *SeSAMS* showed expression higher in the leaves of plants from field; the expression difference between roots was not statistically significant. *SeBADH*, *SeCMO*, and *SeP5CS* showed higher expression in roots and leaves from field plants

4 Conclusion

The internodal regions with axillary buds were good material for the propagation for *S. edulis*. The use of activated charcoal after micropropagation improved the growth and development of the seedling without the need to use growth regulators. Gene expression by qRT-PCR analysis revealed higher expression of *SeBADH*, *SeCMO*, and, *SeP5CS* genes in the roots and leaves from plants collected in the field as well as from *in vitro* plants. However, the expression level of *SeSAMS* was higher only in the leaves of plants collected in the field when compared to those cultivated *in vitro*.

Funding Statement: This research was financially supported by Universidad Autónoma de Aguascalientes (PIBT18-1) and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (174795).

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interest to report regarding the present study.

References

1. Flowers, T. J., Colmer, T. D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 179(4), 945–963. DOI 10.1111/j.1469-8137.2008.02531.x.
2. Rozentsvet, O. A., Nesterov, V. N., Bogdanova, E. S. (2017). Structural, physiological, and biochemical aspects of salinity tolerance of halophytes. *Russian Journal of Plant Physiology*, 64(5), 464–477. DOI 10.1134/S1021443717040112.
3. Liang, W., Ma, X., Wan, P., Liu, L. (2018). Plant salt-tolerance mechanism: a review. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 495(1), 286–291. DOI 10.1016/j.bbrc.2017.11.043.
4. Sahu, B. B., Shaw, B. P. (2009). Isolation identification and expression analysis of salt-induced genes in *Suaeda maritima* a natural halophyte using PCR-based suppression subtractive hybridization. *BMC Plant Biology*, 9(1), 69. DOI 10.1186/1471-2229-9-69.

5. Zhang, L., Ma, X. L., Zhang, Q., Ma, C. L., Wang, P. P. et al. (2001). Expressed sequence tags from a NaCl-treated *Suaeda salsa* cDNA library. *Gene*, 267(2), 193–200. DOI 10.1016/S0378-1119(01)00403-6.
6. Diray-Arce, J., Clement, M., Gul, B., Khan, M. A., Nielsen, B. L. (2015). Transcriptome assembly, profiling and differential gene expression analysis of the halophyte *Suaeda fruticosa* provides insights into salt tolerance. *BMC Genomics*, 16(1), 353. DOI 10.1186/s12864-015-1553-x.
7. Jin, H., Dong, D., Yang, Q., Zhu, D. (2016). Salt-responsive transcriptome profiling of *Suaeda glauca* via RNA sequencing. *PLoS One*, 11(3), e0150504. DOI 10.1371/journal.pone.0150504.
8. Delauney, A. J., Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal*, 4(2), 215–223. DOI 10.1046/j.1365-313X.1993.04020215.x.
9. Zhang, C. S., Lu, Q., Verma, D. P. S. (1995). Removal of feedback inhibition of Δ_1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 270(35), 20491–20496. DOI 10.1074/jbc.270.35.20491.
10. Hameed, A., Khan, M. A. (2011). Halophytes: biology and economic potentials. *Karachi University Journal of Sciences*, 39, 40–44.
11. Rzedowski, G. D., Rzedowski, J. (2005). Flora fanerogámica del Valle de México. *1a reimp. Instituto de Ecología, AC y Comisión Nacional para el Conocimiento y Usos de la Biodiversidad*. Pátzcuaro (Michoacán), 1406.
12. Noguez, H. R., Carballo, C. A., Flores, O. H. (2013). *Suaeda edulis* (chenopodiaceae) una nueva especie de lagos salinos del centro de México. *Botanical Sciences*, 91(1), 19–25. DOI 10.17129/botsci.400.
13. Brandt, R., Lomonosova, M., Weising, K., Wagner, N., Freitag, H. (2015). Phylogeny and biogeography of *Suaeda* subg Brezia (Chenopodiaceae/Amaranthaceae) in the Americas. *Plant Systematics and Evolution*, 301(10), 2351–2375. DOI 10.1007/s00606-015-1233-y.
14. Song, J., Wang, B. (2015). Using euhalophytes to understand salt tolerance and to develop saline agriculture: *Suaeda salsa* as a promising model. *Annals of Botany*, 115(3), 541–553. DOI 10.1093/aob/mcu194.
15. Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. DOI 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
16. Gurudeeban, S., Ramanathan, T., Satyavani, K., Dhinesh, T. (2011). Standardization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of *Suaeda* sp. *Asian Journal of Biotechnology*, 3(5), 486–492. DOI 10.3923/ajbkr.2011.486.492.
17. Cao, J., Wang, L., Lan, H. (2016). Validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in *Suaeda aralocaspica* an annual halophyte with heteromorphism and C4 pathway without Kranz anatomy. *PeerJ*, 4, e1697. DOI 10.7717/peerj.1697.
18. Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E. C., de Klerk, G. J., Roberts, A. et al. (2008). The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. George, E. F., Hall, M. A., de, J. (Eds.). *Plant Propagation by Tissue Culture*. pp. 115–173. Dordrecht: Springer.
19. Aldahhak, O., Salim, Z., Teixeira da Silva, J. A., Abdul-Kader, A. M. (2010). *In vitro* approach to the multiplication of a halophyte species forage shrub *Atriplex halimus* L. and *in vitro* selection for salt tolerance. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 4(1), 8–14.
20. Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26(6), 618–631. DOI 10.1016/j.biotechadv.2008.08.003.
21. Yu, J., Li, Y., Tang, W., Liu, J., Lu, B. R. et al. (2014). The accumulation of glycine betaine is dependent on choline monooxygenase (OsCMO), not on phosphoethanolamine N-Methyltransferase (OsPEAMT1) in rice (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Plant Molecular Biology Reporter*, 32(4), 916–922. DOI 10.1007/s11105-014-0703-7.
22. Lim, C. C., Liu, J. Z., Pua, E. C. (2002). Characterization of S-adenosylmethionine synthetase genes and its expression is associated with ethylene synthesis in mustard (*Brassica juncea*). *Physiologia Plantarum*, 116(4), 522–530. DOI 10.1034/j.1399-3054.2002.1160411.x.
23. Pulla, R. K., Kim, Y. J., Parvin, S., Shim, J. S., Lee, J. H. et al. (2009). Isolation of S-adenosyl-L-methionine synthetase gene from *Panax ginseng* C. A. Meyer and analysis of its response to abiotic stresses. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(3), 267–275. DOI 10.1007/s12298-009-0030-x.

24. Li, X. D., Xia, B., Wang, R., Xu, S., Jiang, Y. M. et al. (2013). Molecular cloning and characterization of S-adenosylmethionine synthetase gene from *Lycoris radiata*. *Molecular Biology Reports*, 40(2), 1255–1263. DOI 10.1007/s11033-012-2168-9.
25. Takashi, H., Rungaroon, W., Etsuko, A., Hiroshi, I., Kenji, A. et al. (2002). Functional characterization of choline monooxygenase, an enzyme for betaine synthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41352–41360. DOI 10.1074/jbc.M205965200.
26. Redondo-Gómez, S., Mateos-Naranjo, E., Cambrollé, J., Luque, T., Figueroa, M. E. et al. (1998). Carry-over of differential salt tolerance in plants grown from dimorphic seeds of *Suaeda splendens*. *Annals of Botany*, 102(1), 103–112.
27. Askari, H., Edqvist, J., Hajheidari, M., Kafi, M., Salekdeh, G. H. (2006). Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves. *Proteomics*, 6(8), 2542–2554. DOI 10.1002/pmic.200500328.
28. Wang, J. Y., Tong, S. M., Li, Q. L. (2013). Constitutive and salt-inducible expression of SIBADH gene in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L. cv Micro-Tom) enhances salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 432(2), 262–267. DOI 10.1016/j.bbrc.2013.02.001.
29. Kuttan, S., Sankararamasubramanian, H. M., Parida, A. K. (2018). Choline monooxygenase transcript expression triggers glycine betaine accumulation in *Suaeda maritima* when subjected to a salt concentration optimal for its growth. *bioRxiv*, 314419.
30. Wei, C., Cui, Q., Zhang, X. Q., Zhao, Y. Q., Jia, G. X. (2016). Three P5CS genes including a novel one from *Lilium regale* play distinct roles in osmotic, drought and salt stress tolerance. *Journal of Plant Biology*, 59(5), 456–466. DOI 10.1007/s12374-016-0189-y.

AGRADECIMIENTOS

Al **CONACyT** por la beca otorgada para llevar a cabo el doctorado (No. 1747).

A la **UAA** y al **Centro de Ciencias Básicas**, por abrirme las puertas para realizar mis estudios de Posgrado.

Al **Dr. José Francisco Morales Domínguez**, por la asesoría como Tutor de este trabajo, por su confianza, orientación y apoyo.

A los miembros de mi comité Tutoral por sus enseñanzas, sus atenciones y todo el apoyo:

Dra. Ruth Elena Soria Guerra

Dra. Ana Erika Ochoa

Dr. Eugenio Pérez Molphe Blach

A la **Dra. María Hilda Flores Olvera** y al **Dr. Gilberto Alejandro Ocampo Acosta**, por la orientación en la identificación de la planta modelo de estudio.

A mis compañeros de laboratorio: **Hans, Ana, Carlos, Caro, David, Juan Pablo, Mario Mejía, Mario Arzate, Mariana, Vivian, Fer** y **Dra. Cristina**, por las pláticas, las risas, los consejos y las experiencias vividas.

A **Mariana Tiscareño**, por su colaboración en este proyecto y por su amistad.

A la coordinación del Doctorado.



DEDICATORIA

A mi esposo Hans y a mis hijos Nicole y Christian,
a mi mamá la Sra. Gloria Rojas y a mis hermanas Sonia y Ema
por ser siempre mi apoyo, mi fuerza, mi inspiración, mi todo.

INDICE GENERAL

INDICE DE TABLAS	3
INDICE DE FIGURAS	4
ACRÓNIMOS.....	6
RESUMEN EN ESPAÑOL.....	7
RESUMEN EN INGLÉS	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. MARCO TEÓRICO.....	11
2.1 Aleteraciones en plantas causadas por la salinidad del suelo	11
2.2 Mecanismos de tolerancia a la salinidad	11
2.2.1 Biosíntesis de osmoprotectores.....	12
2.2.1.1 Biosíntesis y función de GB	12
2.2.1.2 Biosíntesis y función de Pro	14
2.2.2 Compartimentalización del sodio	15
2.2.3 Sobreexpresión de factores de transcripción	15
2.2.4 Regulación en el transporte de agua a través de la membrana	16
2.2.5 Regulación de genes antioxidantes.....	18
2.2.6 Modificaciones en la pared celular	18
2.3 Las plantas halófitas.....	19
2.3.1 El género <i>Suaeda</i>	19
2.3.1.1 <i>Suaeda edulis</i>	20
2.4 El cultivo in vitro de plantas halófitas	21
3. JUSTIFICACIÓN.....	21
4. HIPÓTESIS	22

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

5. OBJETIVOS23

OBJETIVO GENERAL..... 23

OBJETIVOS PARTICULARES..... 23

6. MATERIALES Y MÉTODOS23

6.1 Colecta de la planta y verificación taxonómica..... 23

6.2 Análisis del suelo del cráter y de la raíz y follaje de la planta 25

6.3 Establecimiento *in vitro* de la planta..... 25

6.3.1 Desinfección del material vegetal..... 26

6.3.2 Elección del tipo de explante 26

6.3.3 Preparación del medio de cultivo 26

6.5 Identificación de los genes *SAMS*, *PEAMT*, *CMO*, *BADH*, *P5CS*, *VP*, *DREB2*, *TIP*, *APX* y α -*EXP4* en *S. edulis* 27

6.5.1 Extracción de ADN..... 27

6.5.2 Diseño de oligonucleótidos..... 29

6.5.3 Amplificación de los genes de interés por PCR..... 30

6.5.4 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas..... 31

6.6 Análisis de expresión génica 32

6.6.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc 32

6.6.2 Diseño de oligonucleótidos..... 33

6.6.3 Amplificación de los genes de interés por qRT-PCR..... 34

6.7 Elaboración de la una librería de DNAc *S. edulis*..... 34

6.7.2 Fraccionamiento del ADNc y reacción de recombinación 35

6.7.3 Preparación y transformación de células competentes 36

6.7.4 Extracción de plásmidos y análisis de rendimiento 37

6.4 Visualización de los estomas de la panta..... 38

7. RESULTADOS39

7.1 Verificación taxonómica de la planta..... 39

7.2 Componentes del suelo del cráter y de la raíz y follaje de la planta	41
7.3 Establecimiento <i>in vitro</i> de <i>S. edulis</i>	42
7.3.1 Elección del tipo de explante	42
7.3.2 Desarrollo en medio con carbón activado	44
7.4 Identificación de los genes <i>SAMS</i> , <i>PEAMT</i> , <i>CMO</i> , <i>BADH</i> , <i>P5CS</i> , <i>VP</i> , <i>DREB2</i> , <i>TIP</i> , <i>APX</i> y α - <i>EXP4</i> en <i>S. edulis</i>	45
7.4.1 Extracción de ADN.....	45
7.5 Diseño de oligonucleótidos y amplificación por PCR	46
7.5.1 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas.....	48
7.5.1.1 S-adenosil metionina sintetasa (<i>SAMS</i>)	48
7.5.1.2 Fosfoetanolamina n-metiltransferasa (<i>PEAMT</i>).....	48
7.5.1.3 Colina monooxigenasa (<i>CMO</i>).....	50
7.5.1.4 Betaína aldehído deshidrogenasa (<i>BADH</i>)	52
7.5.1.5 Δ -pirrolina-5-carboxilato sintetasa (<i>P5CS</i>)	52
7.5.1.6 Pirofosfatasa vacuolar-A (<i>VP</i>).....	54
7.5.1.7 Proteína de unión a elementos sensibles a la deshidratación (<i>DREB2</i>).....	58
7.6 Expresión de los genes de interés en <i>S. edulis</i>	60
7.7 Librería de DNAc de <i>S. edulis</i>	66
7.8 Visualización de estomas de <i>S. edulis</i>	68
8. DISCUSIONES	71
9. CONCLUSIONES	84
10. BIBLIOGRAFIA	85
ANEXOS	100

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Condiciones de amplificación por PCR para los genes <i>SAMS</i> , <i>PEAMT</i> , <i>CMO</i> , <i>BADH</i> , <i>P5CS</i> , <i>VP</i> , <i>DREB2</i> , <i>TIP</i> , <i>APX</i> y α - <i>EXP4</i>31
Tabla 2	Sales y minerales encontrados en el suelo del cráter Rincón de Parangueo.....42
Tabla 3	Minerales encontrados en la parte aérea y en la raíz de <i>S. edulis</i>42
Tabla 4	Oligonucleótidos iniciadores dirigidos a cada uno de los genes de interés.....48
Tabla 5	Propiedades fisicoquímicas de los péptidos parciales putativos identificados en <i>S. edulis</i>61
Tabla 6	Iniciadores para qRT-PCR diseñados a partir de las secuencias aisladas de <i>S. edulis</i>62

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ruta biosintética de GB en plantas	13
Figura 2	Ruta biosintética de Pro en plantas.....	14
Figura 3	Hoya Rincón de Parangueo en Valle de Santiago, Guanajuato, Mex.....	24
Figura 4	Amplificación ITS en ADN de <i>S. edulis</i>	40
Figura 5	Consenso de árboles más parsimoniosos generados a partir de la región ITS de especies de <i>Suaeda</i>	41
Figura 6	Explantos de <i>S. edulis</i> durante el proceso de desinfección con el Método 1...43	
Figura 7	Explantos de tejido vegetativo de <i>S. edulis</i> en medio de cultivo MS	44
Figura 8	Explantos de tejido reproductivo de <i>S. edulis</i> en medio de cultivo MS	44
Figura 9	Explantos de hoja de <i>S. edulis</i> en medio de cultivo MS.....	45
Figura 10	Explantos de tallo de <i>S. edulis</i> en medio de cultivo MS.....	45
Figura 11	Establecimiento y micropropagación de <i>S. edulis</i>	46
Figura 12	ADN genómico de <i>S. edulis</i>	47
Figura 13	Amplificación de <i>P5CS</i> , <i>VP</i> , <i>SAMS</i> , <i>PEAMT</i> , <i>CMO</i> y <i>BADH</i> en ADN de <i>S. edulis</i>	47
Figura 14	Amplificación de <i>TIP</i> , <i>DREB2</i> , α - <i>EXP4</i> y <i>APX</i> en ADN de <i>S. edulis</i>	48
Figura 15	Alineamiento, historia evolutiva y modelado estructural hipotético de SeSAMS.....	50
Figura 16	Representación gráfica de los aminoácidos conservados en SeSAMS.....	51
Figura 17	Alineamiento, historia evolutiva y modelado estructural hipotético de SePEAMT	52
Figura 18	Representación gráfica de los aminoácidos conservados en SePEAMT.....	52
Figura 19	Alineamiento, historia evolutiva y modelado estructural hipotético de SeCMO	54
Figura 20	Representación gráfica de los aminoácidos conservados en SeCMO.....	55
Figura 21	Alineamiento, historia evolutiva y modelado estructural hipotético de SeBADH	56
Figura 22	Representación gráfica de los aminoácidos conservados en SeBADH.....	56
Figura 23	Alineamiento, historia evolutiva y modelado estructural hipotético de SeP5CS	57
Figura 24	Representación gráfica de los aminoácidos conservados en SeP5CS.....	57
Figura 25	Alineamiento, historia evolutiva y modelado estructural hipotético de SeVP.....	58
Figura 26	Representación gráfica de los aminoácidos conservados en SeVP.....	59
Figura 27	Alineamiento, historia evolutiva y modelado estructural hipotético de SeDREB2.....	60

Figura 28	Representación gráfica de los aminoácidos conservados en SeDREB2.....	61
Figura 29	Amplificación de SeP5C5, SeVP, SeSAMS, SePEAMT y SeCMO en ADNc de <i>S. edulis</i>	62
Figura 30	Expresión relativa de <i>SAMS</i> , <i>BADH</i> , <i>CMO</i> y <i>P5C5</i> en <i>S. edulis</i>	63
Figura 31	Expresión relativa de <i>VP</i> en <i>S. edulis</i>	64
Figura 32	Expresión relativa de <i>DREB2</i> en <i>S. edulis</i>	64
Figura 33	Expresión relativa de <i>TIP</i> en <i>S. edulis</i>	65
Figura 34	Expresión relativa de <i>APX</i> en <i>S. edulis</i>	66
Figura 35	Expresión relativa de α - <i>EXP4</i> en <i>S. edulis</i>	66
Figura 36	Células competentes One Shot® Top 10 transformadas con el att-ADNc de <i>S. edulis</i>	67
Figura 37	ADN plasmídico de la Genoteca de <i>S. edulis</i>	68
Figura 38	Amplicones M13 en ADN plasmídico de la librería de <i>S. edulis</i>	68
Figura 39	Amplicones de <i>SAMS</i> y M13 en ADN plasmídico de la librería de <i>S. edulis</i>	68
Figura 40	Amplicones de <i>P5CS</i> , <i>VP</i> , <i>CMO</i> , <i>PEAMT</i> y <i>BADH</i> en ADN plasmídico de la librería de <i>S. edulis</i>	69
Figura 41	Micrografías electrónicas de barrido de estomas en hojas de <i>S. edulis</i> provenientes de cráter	70
Figura 42	Micrografías electrónicas de barrido de estomas en hojas de <i>S. edulis</i> provenientes de cultivos <i>in vitro</i>	71

ACRÓNIMOS

α -EXP4: expansina α -4

APX: proteína ascorbato peroxidasa

ARN: ácido ribonucléico

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ácido desoxirribonucleico complementario

BADH: betaína aldehído deshidrogenasa

CMO: colina monooxigenasa

DREB2: proteína de unión al elemento de respuesta a deshidratación

EROs: Especies reactivas de oxígeno

GB: glicina betaína

PEAMT: fosfoetanolamina N-metiltransferasa

PCR: amplificación por tiempo real

Pro: prolina

P5CS: pirrolina-5-carboxilato sintetasa

qRT-PCR: amplificación cuantitativa por tiempo real

SAMS: S-adenosilmetionina sintetasa

TIP: proteína intrínseca de tonoplasto

VP: pirofosfatasa vacuolar

RESUMEN EN ESPAÑOL

La salinidad es uno de los principales tipos de estrés abiótico que limita el crecimiento y desarrollo de muchas plantas en todo el mundo, causándoles incluso la muerte. Las plantas halófitas, han desarrollado mecanismos tanto bioquímicos como moleculares que les permiten tolerar estas condiciones, restablecer y mantener su actividad metabólica adecuada. En este estudio se trabajó con *Suaeda edulis*, una planta halófila que crece en un cráter con suelo sódico-salino ubicado en la región central de México. Se estableció un protocolo de propagación *in vitro* a partir de brotes axilares en medio MS suplementado con 2 g/L de carbón activado, así mismo, se realizaron estudios mediante marcadores moleculares ITS para corroborar la identidad de la planta. Se identificaron y se realizaron estudios bioinformáticos para los genes involucrados en la síntesis de la glicinobetaina: *SAMS*, *PEAMT*, *CMO* y *BADH*; en la síntesis de prolina: *P5CS*; en la compartimentalización del Na⁺ en las vacuolas: *VP* y para un gen codificante de un factor de transcripción asociado al estímulo de genes de respuesta a salinidad: *DREB2*. Las secuencias putativas de aminoácidos de estos genes comparten 90-95% de identidad con otras secuencias reportadas en las bases de datos y presentan motivos y dominios conservados propios de cada tipo de enzima. El análisis de expresión mediante qRT-PCR en raíces y hojas de *S. edulis* provenientes del cráter y de cultivos *in vitro*, fue realizado para los genes *SAMS*, *CMO*, *BADH*, *P5CS*, *VP* y *DREB2*; así como también para un gen codificante de una proteína intrínseca de tonoplasto: *TIP*; un gen codificante de una acuaporina: *APX*; y para un gen codificante de una expansina: α -*EXP4*, y se encontró que la expresión de *BADH*, *CMO*, *P5CS*, *VP*, *DREB2* y α -*EXP4* fue mayor en hojas y raíces de plantas del cráter, en cambio la expresión de *SAMS* y *APX* fue mayor en las hojas de las plantas del cráter, pero no en las raíces, y para el gen *TIP* no hubo diferencias estadísticamente significativas en sus niveles de expresión. También se realizó una librería de cDNA a partir de la parte aérea de la planta, y un estudio sobre la fisiología de los estomas de las plantas provenientes del cráter y de las plantas cultivadas *in vitro*.

RESUMEN EN INGLÉS

Salinity is one of the main types of abiotic stress that limits the growth and development of many plants around the world, even causing death. Halophyte plants have developed both biochemical and molecular mechanisms that allow them to tolerate these conditions, restore and maintain their proper metabolic activity. In this study, we worked with *Suaeda edulis*, a halophyte plant that grows in a crater with sodium-saline soil located in the central region of Mexico. An *in vitro* propagation protocol was established from axillary shoots in MS medium supplemented with activated carbon 2 g / L; likewise, studies were carried out using ITS molecular markers to corroborate the plant identity. Bioinformatics studies were performed for the involved genes in the glycine betaine synthesis: *SAMS*, *PEAMT*, *CMO* and *BADH*; in the proline synthesis: *P5CS*; in the Na⁺ compartmentalization: *VP*; and for a gene encoding a transcription factor associated with genes response to salinity: *DREB2*. The putative amino acid sequences of these genes share 90-95% identity with other sequences reported in the databases and have conserved motifs and specific domains to each type of enzyme. The expression analysis by qRT-PCR in *S. edulis* roots and leaves from crater plants and *in vitro* culture plants was performed for *SAMS*, *CMO*, *BADH*, *P5CS*, *VP* and, *DREB2* genes; as well as for a gene encoding an intrinsic tonoplast protein: *TIP*; a gene encoding an aquaporin: *APX*; and for a gene coding for an expansin: α -*EXP4*; and it was found that the expression level for *BADH*, *CMO*, *P5CS*, *VP*, *DREB2*, and α -*EXP4* was higher in leaves and roots from crater plants, whereas for *SAMS* and *APX* it was higher in the leaves from crater plants, but not in the roots, and for the *TIP* gene there were no statistically significant differences in their expression levels. A cDNA library was also made from the plant shoot, and a study was also carried out about stomata physiology from crater plants and *in vitro* plants.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

1. INTRODUCCIÓN

La salinidad es uno de los principales problemas para los cultivos de interés agrícola, y más de 800 millones de hectáreas en el mundo están afectados por salinidad; las pérdidas mundiales anuales en la producción agrícola de tierras afectadas por la sal superan los 12 mil millones de dólares. Al mismo tiempo, la creciente cantidad de tierra cultivable que se pierde en la expansión urbana está obligando a la producción agrícola a zonas marginales.

A través de millones de años de evolución, las plantas han adquirido diversidad genética y se han adaptado a las perturbaciones ecológicas como la salinización del suelo, que es uno de los principales factores ambientales abióticos que causan pérdidas económicas significativas y una disminución del crecimiento en la mayoría de los cultivos. La alta salinidad del suelo puede causar en las plantas desequilibrio osmótico, toxicidad iónica, alteración de la fotosíntesis y alteraciones en la composición y estructura de la membrana. Para superar los efectos nocivos del estrés salino, algunas plantas realizan cambios a nivel fisiológico a través de una serie de mecanismos que les permiten restablecer y mantener la actividad metabólica adecuada. Entre los principales mecanismos están la compartimentación de Na^+ en las vacuolas, la síntesis de osmoprotectores, la sobreexpresión de factores de transcripción, la regulación en el transporte de agua a través de la membrana y algunas modificaciones que ocurren en la pared celular.

Las plantas que logran llevar a cabo estos procesos son llamadas halófitas y han sido de gran interés y apoyo para los estudios de tolerancia a estrés salino, ya que investigar la manera en que operan sus genes ha permitido dilucidar los mecanismos de tolerancia y utilizar esta información para fortalecer plantas susceptibles. *Suaeda edulis* es un halófito distribuido en suelos salinos-alcálinos de la región central de México; el lago cráter donde habita esta planta es una zona conservada, pero al mismo tiempo un lugar turístico libre, que con la entrada de personas y sus actividades recreativas está siendo destruido poco a poco, al igual que su flora. *S. edulis* y otras especies halófitas constituyen cultivos de importancia económica, y su micropropagación puede ser una vía importante para colaborar con la conservación de especies. Actualmente, no hay informes de cultivo de tejidos *in vitro* ni de estudios bioquímicos o genéticos asociados con la salinidad del suelo en *S. edulis*.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Para comprender los detalles moleculares de la adaptación a la salinidad en esta planta sin disturbar su hábitat, en este trabajo se implementó un sistema de propagación *in vitro*, utilizando como explantes las yemas axilares; esto permitió contar con ejemplares vegetales en el laboratorio, y la posibilidad de proporcionarles nutrientes y reguladores de crecimiento específicos de acuerdo con las necesidades del proyecto.

Se identificó y se analizó mediante PCR y métodos bioinformáticos y filogenéticos las secuencias parciales de la S-adenosilmetionina sintetasa (SAMS), la fosfoetanolamina N-metiltransferasa (PEAMT), la colina monooxigenasa (CMO), la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH), la pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS), la pirofosfatasa vacuolar (VP), y la proteína de unión al elemento de respuesta a deshidratación (DREB2) en *S. edulis*.

Los niveles de expresión de los genes *SAMS*, *CMO*, *BADH*, *P5CS*, *VP* y *DREB2*, además de un gen codificante para una proteína intrínseca de tonoplasto (*TIP*), otro para una proteína ascorbato peroxidasa (*APX*) y otro para una expansina (α -*EXP4*), fueron analizados mediante qRT-PCR, para comparar la expresión génica entre raíces y hojas de *S. edulis* provenientes del cráter donde habitan, con los de raíces y hojas de *S. edulis* cultivadas *in vitro*. Este análisis reveló una mayor expresión de los genes *BADH*, *CMO*, *P5CS*, *VP*, *DREB2* y α -*EXP4* en las raíces y hojas de las plantas recolectadas en el cráter. Sin embargo, el nivel de expresión de *SAMS* y *APX* fue estadísticamente más elevado solo en las hojas de las plantas del cráter, en comparación con las cultivadas *in vitro*, pero no así en las raíces; el gen *TIP* no mostró diferencia estadísticamente significativa en su expresión.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Aleteraciones en plantas causadas por la salinidad del suelo

La elevada salinidad del suelo puede causar importantes desequilibrios y efectos adversos en las plantas, tales como inhibición en la absorción de agua, reducción en la expansión celular, alteración en las proporciones de K^+/Na^+ y en las concentraciones y citotoxicidad iónica del Na^+ , Cl^- y SO_4^{2-} , así como también la divergencia en el flujo de electrones en las principales cadenas de transporte como la fotosíntesis y la respiración, lo que causa una sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ERO) que son responsables de la oxidación de biomoléculas vitales como lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos, alternado así el funcionamiento metabólico y fisiológico de las plantas (Zhu, 2002; Zhang & Shi, 2013; Cabot et al., 2014; Maathuis et al., 2014; Singh et al., 2017).

Particularmente, la citotoxicidad iónica es causada por el remplazo de Na^+ por K^+ en reacciones bioquímicas ocasionando cambios conformacionales con pérdida de función en proteínas, ya que los iones Na^+ y Cl^- interfieren con las interacciones no covalentes entre los aminoácidos. La alteración del balance metabólico causada por toxicidad iónica, estrés osmótico y deficiencias nutricionales bajo salinidad pueden favorecer también al estrés oxidativo (Zhu, 2002), mientras que la entrada de Na^+ a través de canales iónicos no específicos puede causar la despolarización de la membrana que activa los canales de Ca^{2+} (Sanders et al., 1999; Abdallah et al., 2013) y esto genera oscilaciones de Ca^{2+} y señales de estrés salino.

2.2 Mecanismos de tolerancia a la salinidad

Para superar los efectos dañinos del estrés salino, algunas plantas realizan modificaciones en su fisiología y anatomía siguiendo una serie de procesos que les permiten restablecer la actividad metabólica adecuada (Flowers, 2004; Flowers & Colmer, 2008); entre estos procesos se encuentran, la biosíntesis de osmoprotectores, la compartimentalización del sodio, la sobreexpresión de factores de transcripción, la regulación en el transporte de agua a través de la membrana y las modificaciones en la pared celular.

2.2.1 Biosíntesis de osmoprotectores

Para mantener y/o restaurar el balance iónico en el citoplasma se acumulan compuestos de bajo peso molecular, llamados osmoprotectores o solutos compatibles debido a que no interfieren con las reacciones bioquímicas normales (Yancey et al., 1982; Ashihara et al., 1997; Hasegawa et al., 2000) y contribuyen a estabilizar las estructuras subcelulares como membranas y proteínas, eliminando radicales libres y funcionando como amortiguadores celulares en potencial redox bajo condiciones de estrés (Rhodes et al., 1999) y como un medio de almacenamiento de carbono y nitrógeno (Bohnert y Jensen, 1996; Chen & Murata, 2000). Cuando la acumulación de estos compuestos es proporcional al cambio de osmolaridad externa dentro de los límites específicos para cada especie, es posible la protección de estructuras y el balance osmótico (Hasegawa et al., 2000). Los solutos compatibles incluyen principalmente manitol (Karakas et al., 1997), trehalosa (Garg et al., 2002), galactinol (Taji et al., 2002) prolina (Pro) (Khatkar & Kuhad, 2000) y glicina betaína (GB) (Rhodes & Hanson, 1993; Khan et al., 2000b).

2.2.1.1 Biosíntesis y función de GB

En la biosíntesis de GB en plantas (Figura 1) participan enzimas citoplásmicas y del cloroplasto. Primero, la síntesis de colina se lleva a cabo en varios pasos enzimáticos en el citoplasma y entre las principales enzimas involucradas están la S-adenosilmetionina sintetasa (SAMS) y la fosfoetanolamina metil transferasa (PEAMT). La SAMS es responsable de la metilación de los compuestos de fosfoetanolamina para sintetizar la colina que luego será transporta al cloroplasto, y PEAMT cataliza tres N-metilaciones secuenciales de etanolamina (EA), fosfoetanolamina (PEA), o fosfatidiletanolamina (Ptd-EA). Una vez en el cloroplasto la colina monooxigenasa (CMO) actúa para sintetizar el aldehído de betaína (Brouquisse et al., 1989; Rhodes & Hanson, 1993) que luego se convierte a GB por la betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) (Weigel et al., 1986; Sahu & Shaw 2009). La GB actúa entonces como osmoprotector para estabilizar la estructura cuaternaria de las proteínas (Bohnert & Jensen, 1996; Chen & Murata, 2000) y la síntesis de este osmoprotector se incrementa como respuesta al estrés salino (Khan et al., 1998, 1999, 2000a; Saneoka et al., 1999; Wang & Nil, 2000). A nivel fisiológico, la respuesta adaptativa al NaCl en algunas plantas como *Suaeda marítima* es altamente visible en términos de sobreexpresión de los

genes relacionados con su síntesis, tales como *SAMS*, *PEAMT*, *CMO* y *BADH* (Sahu & Shaw, 2009).

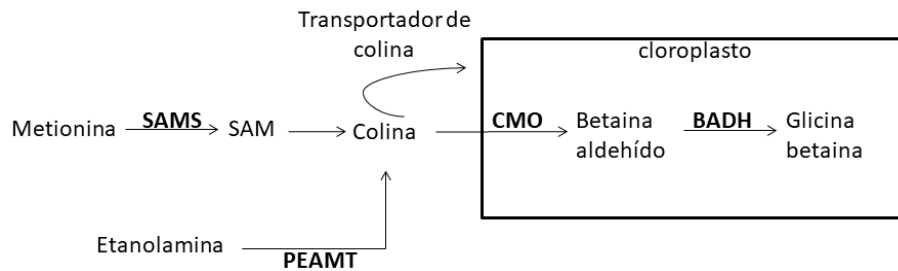


Figura 1. Ruta biosintética de GB en plantas. En el citoplasma, la metionina es transformada a S-adenosil metionina y a colina, posteriormente la colina ingresa al cloroplasto y es transformada a betaina aldehído y luego a Glicina betaina. Otra vía es la síntesis de colina por tres N-metilaciones secuenciales catalizadas por la fosfoetanolamina metil transferasa (*PEAMT*). Figura modificada de Sahu & Shaw (2009).

Específicamente, la caracterización molecular de *CMO* permitió demostrar que las regiones Cys-181 y His-287 son esenciales para la actividad de la proteína, y que la expresión incrementada del gen codificante en el cloroplasto podría ser un paso importante para aumentar el nivel de betaina en plantas no acumuladoras (Hibino et al., 2002). Así, *CMO* ha sido usada para modificar plantas de tabaco y aumentar su resistencia al estrés salino (Nuccio et al., 1998; McNeil et al., 2000; Nuccio, et al., 2000).

Respecto a *PEAMT*, se observó un aumento en su actividad en *Atriplex nummularia* (McNeil et al., 2000) y en espinaca (*Spinacia oleracea*) (Summers & Weretilnyk, 1993) previo a la acumulación de GB en respuesta a estrés salino; y en *S. marítima*, también previo a la acumulación de GB, se reportó el aumento en la actividad de *SAMS* (Sahu & Shaw 2009).

Sobre *BADH*, se ha demostrado que su actividad aumenta casi al doble en hojas de espinaca expuestas a 200 mmol/L de NaCl (Weretilnyk y Hanson, 1990), y en caña de azúcar se observó que cuando la concentración del NaCl alcanza los 500 mmol/L, la expresión del gen aumenta hasta cuatro veces (McCue & Hanson, 1992) lo que indica que también hay una correlación directa entre el aumento en la actividad de *BADH* y la presencia de sal en el medio. Zang et al. (2008), identificaron la región promotora inducida por estrés salino en el gen *BADH* de *Suaeda liaotungensis*; esto

podría permitir utilizar los promotores *BADH* inducibles y expresarlos en plantas sensibles para mejorar su tolerancia al estrés salino.

2.2.1.2 Biosíntesis y función de Pro

Para la biosíntesis de Pro participan dos enzimas (Figura 2) la primera es pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS), que toma glutamato como sustrato y lo convierte en glutamato semialdehído, que se transforma en pirrolina-5-carboxilato por ciclación espontánea, y luego la segunda, la enzima pirrolina 5 carboxilato reductasa (P5CR), la convierte en Pro (Delauney & Verma 1993). Se han realizado varios estudios de expresión con estas dos enzimas con altas concentraciones de sal y se ha demostrado que la P5CS es la enzima que limita la velocidad de la reacción y es inhibida por Pro (Zhang et al., 1995; Hong 2000).

Para la caracterización y análisis de la expresión de P5CS, se han utilizado algunas especies de *Suaeda*, como *S. corniculata* (Wang et al., 2016) y *S. maritima* (Sahu & Shaw 2009) destacando la sobreexpresión del gen en los procesos de adaptación al estrés salino.

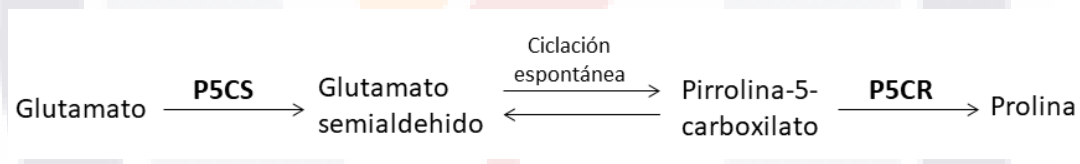


Figura 2. Ruta biosintética de Prolina en plantas. El glutamato es el presursor principal de la enzima pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS) que lo convierte en glutamato semialdehído y luego se transforma en pirrolina-5-carboxilato por ciclación espontánea, y este es transformado a Prolina por la acción de la pirrolina 5 carboxilato reductasa (P5CR) (Delauney & Verma 1993).

Diversos estudios han demostrado que la rápida descomposición de Pro durante el estrés puede proporcionar suficientes agentes reductores que apoyan a la fosforilación oxidativa mitocondrial y a la generación de ATP para la recuperación del estrés y la reparación de los daños inducidos por el mismo (Hare & Cres, 1997; Hare et al., 1998) y que mediante aplicación exógena, la Pro puede contribuir con el crecimiento de la planta y con el aumento en su tolerancia a la salinidad, ya sea por osmoprotección (Handa et al., 1986; Csonka & Hanson, 1991) o por crioprotección (Santarius, 1992). Incluso, ya en el enfoque transgénico se ha demostrado que en

plantas modificadas genéticamente, la significativa sobreproducción inducida de Pro reduce el nivel de radicales libres y mejora la tolerancia al NaCl (Hong et al., 2000).

2.2.2 Compartimentalización del sodio

El transporte activo de iones mediante proteínas selectivas de membrana para mantener la homeostasis iónica (Na^+ , K^+ y Ca^{+2}) es un mecanismo crucial para la adaptación a condiciones salinas en las plantas (Serrano et al., 1999; Hasegawa et al., 2000). El transporte del Na^+ desde el citoplasma hasta la vacuola, realizado por la bomba Na^+/K^+ (Fukuda et al., 1998), es dependiente de la actividad V-ATPasa y V-PPasa, estas enzimas establecen un gradiente electroquímico de H^+ en el tonoplasto que energiza el transporte de Na^+ contra el gradiente de concentración (Binzel & Ratajczak, 2001) que permite que quede almacenado en las vacuolas. Los genes que codifican enzimas involucradas en el transporte activo de iones, por ejemplo el gen de la pirofosfatasa vacuolar (VP), ha mostrado una expresión significativamente incrementada en plantas de *Suaeda aralocaspica* en respuesta a 500 mM de NaCl (Cao et al., 2015).

2.2.3 Sobreexpresión de factores de transcripción

Numerosos genes relacionados con el estrés abiótico, factores de transcripción (TF) y proteínas de unión a elementos sensibles a la deshidratación (DREB) se han aislado de diferentes especies de plantas y se han utilizado para estudiar la tolerancia al estrés (Agarwal et al., 2013). En *Arabidopsis thaliana* y en *Oryza sativa* se han identificado 300 genes inducidos por salinidad, sequía y frío, de éstos más de la mitad son inducidos por salinidad y también son inducidos por sequía, lo que podría reflejar la existencia de una confluencia entre las respuestas a la salinidad y a la sequía. Sin embargo, solo 10 % de los genes inducidos por sequía también son inducidos por frío (Nakashima & Yamaguchi-Shinozaki, 2010). Bajo condiciones de estrés, la regulación en la expresión de genes depende de varios factores de transcripción y de sus interacciones con secuencias reguladoras en el promotor de los genes blanco (Agarwal & Jha, 2010). Los factores de transcripción son proteínas que se unen específicamente a secuencias cortas de ADN que se encuentran en la región promotora del gen y que interactúan con el complejo de pre-iniciación de la transcripción para inducir o inhibir la actividad de la ARN polimerasa II, modulando así la tasa de transcripción de sus genes blanco (Nakashima et al., 2009).

Los cDNAs DREB presentan la secuencia A/GCCGAC hacia el extremo 5' identificada como un promotor actuando en cis- para regular la expresión génica en respuesta a distintos tipos de estrés, entre ellos, salinidad (Dubouzet et al., 2003). Zhang et al. (2015), demostraron en plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* con el gen codificante para DREB de *Suaeda salsa* (*SsDREB*); un aumento en la tolerancia a la salinidad, ya que las plantas transgénicas mostraron mejor crecimiento, mayor contenido de clorofila, una tasa neta de fotosíntesis, altos niveles de prolina y mayor expresión de genes de respuesta a estrés. Al respecto los autores sugieren que el factor de transcripción *SsDREB* está involucrado con la tolerancia a salinidad por activar diferentes genes de respuesta a estrés salino. También en *Oriza sativa* y en *Salicornia brachiata* se ha demostrado la sobreexpresión de *OsDREB2A* y *SbDREB2A* respectivamente, en respuesta a estrés por salinidad (Dubouzet et al., 2003; Gupta et al., 2014).

2.2.4 Regulación en el transporte de agua a través de la membrana

La exposición a salinidad cambia el estado de agua en las plantas y enciende estrategias específicas para ajustar la ósmosis celular y controlar la toma y pérdida de agua (Hasegawa et al., 2000; Fricke & Peters, 2002). En este proceso están involucradas las proteínas intrínsecas del tonoplasto (TIP), las cuales forman parte de las llamadas acuaporinas (AQPs), que son proteínas que facilitan el transporte de moléculas de agua a través de la pared celular.

Al respecto se ha demostrado que el gen *PgTIP1* de *Panax ginseng* aumenta la tolerancia a salinidad en *A. thaliana* transgénica (Peng et al., 2007). Por otro lado, cuando se trata de regular el transporte de agua, los estomas son estructuras involucradas de manera importante en este proceso, ya que los estomas son grupos de dos o más células epidérmicas especializadas cuya función es regular el intercambio gaseoso y la transpiración. Se encuentran en las partes verdes aéreas de la planta, particularmente en las hojas. Cada estoma está formado por 2 células especializadas llamadas oclusivas que dejan entre sí una abertura llamada ostíolo o poro, el cuál conduce a un amplio espacio intercelular llamado cámara subestomática, poniendo en comunicación el sistema de espacios intercelulares con el aire exterior. En muchas plantas hay 2 o más células adyacentes a las oclusivas y asociadas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

funcionalmente a ellas. Estas células, morfológicamente distintas a las fundamentales se llaman células anexas, subsidiarias o adjuntas y los cambios en la turgencia relativa de estas células y de las células anexas, causados por cambios en el potencial osmótico, generan movimientos estomáticos (Heath, 1981; Hedrich & Shabala, 2018).

Los estomas representan la interfase entre el ambiente y la planta, funcionando como esfínteres microscópicos en la epidermis de la parte aérea de las plantas, en la cual se realiza el balance entre el CO₂ consumido y la pérdida de agua para obtener carbón fotosintético (Araújo et al., 2011). La transpiración estomatal representa casi el 95 % de la pérdida de agua por la planta (Ache et al., 2010). Por lo tanto, la ganancia de biomasa por parte de la planta se encuentra relacionada con la cantidad de agua que se ha evaporado a través de sus estomas.

Cuando las células guarda del estoma cambian su volumen, ajustan el tamaño de poro del estoma, debido al consumo de K⁺ y aniones inorgánicos, y la biosíntesis de compuestos orgánicos (Hedrich, 2012). El elemento clave para el aumento de tamaño de las celdas guarda son las bombas de protones conducidas por ATP (Yamauchi et al, 2016). Si esta bomba se activa y además, se bloquea la salida de aniones (Hiyama et al., 2017) habrá canales de K⁺ que se abran y este flujo de K⁺ en el citoplasma permitirá la acumulación de aniones de equilibrio de carga en la célula guarda después del gradiente electroquímico (Roelfsema and Hedrich 2005; Marten et al., 2007). El gradiente de H⁺ dirigido al interior de la célula también permite simporte de aniones como el Cl⁻ y NO³⁻. Esta mayor captación de sales inorgánicas concomitante con la síntesis de malato libera la afluencia de agua a través de acuaporinas (Raschke, 1975; Grondin et al., 2015) por lo que las células protectoras aumentan su tamaño y se abre el poro estomático. Para disminuir la transpiración debe inducirse el cierre estomático, esto ocurre cuando la planta se encuentra en estrés hiperosmótico generado por estrés salino. El proceso inicia con un aumento en la biosíntesis de ABA (Sah et al., 2016) en un proceso dinámico en el que se detectan niveles pico de ABA a los 15 minutos de exposición a la salinidad en las raíces de las plantas y en 30 min en las hojas (Geilfus et al., 2015). Cuando ABA es dirigido a las células guarda se activa una cascada de señalización que involucra fosforilaciones que provocan la apertura de canales aniónicos, la reducción de volumen en las células guarda y por lo tanto el cierre de estomas (Imes et al., 2013; Hedrich et al., 2017).

Conforme aumenta la salinidad, el estrés osmótico que se va generando debido a la elevada concentración de sal fuera de las raíces causa la rápida y severa reducción en la expansión del área foliar (Yeo et al., 1991; Munns et al., 1995; Fricke et al., 2004), además de que se inhibe también la formación de brotes laterales. Por lo tanto, se puede esperar que la variación en la tolerancia al estrés osmótico resulte en una gran diferencia en la tasa de crecimiento total de la planta a lo largo del tiempo, pues las reducciones en la expansión del área foliar total se cuentan como el número de retoños formados, y no como reducción en el área de cualquier hoja individual (Nicolas et al., 1993).

2.2.5 Regulación de genes antioxidantes

Bajo condiciones de estrés salino pueden ocurrir interrupciones en las cadenas de transporte de electrones y entonces el oxígeno molecular como aceptor puede dar lugar a la acumulación de EROs como $^1\text{O}_2$, OH^\cdot , O^{2-} y H_2O_2 las cuales oxidan fuertemente proteínas, lípidos y DNA causando daños potenciales a la integridad de la célula (Groß & Gaupels, 2013). Para combatir la toxicidad de EROS algunas plantas han desarrollado mecanismos antioxidativos que les permiten adaptarse a diferentes tipos de estrés. Estos mecanismos incluyen la participación de varias enzimas antioxidantes como la APX, la superóxido dismutasa (SOD), deshidroascorbato reductasa (DHAR), tioredoxina (Trx), peroxirredoxina (Prx), glutatión peroxidasa (GPX) y glutatión-S-transferasa (GST) (Noctor & Foyer, 1998; Yu et al., 2011; Bose et al., 2013; Wang et al., 2013). Wang et al. (2014), han investigado los cambios a nivel de proteoma en *Halogeton glomeratus* bajo estrés por NaCl, y revelaron elevados niveles de abundancia de APX involucrada en regular el equilibrio de la formación y eliminación de EROs para proteger a la célula contra el estrés oxidativo y el daño celular; APX ha sido utilizada para transformar plantas y conferirles tolerancia a estrés oxidativo (Sarowar et al., 2005; Sleimi et al., 2015).

2.2.6 Modificaciones en la pared celular

Otra respuesta al estrés osmótico en las plantas es la modificación de la pared celular, ya que la salinidad reduce el crecimiento de brotes por medio de la inhibición de la división celular y el alargamiento. Sin embargo, mediante un grupo importante de proteínas llamadas Expansinas (EXP), la pared celular puede romper los enlaces que

se encuentran entre las microfibras de celulosa y así, incrementar la movilidad de los polímeros que forman la matriz (Cosgrove, 2000).

Las EXP se encuentran agrupadas en dos subfamilias, la α y la β ; el subgrupo más grande es el de las α -EXP, que en *Arabidopsis* incluye 26 miembros (McQueen-Mason et al., 1992); posteriormente, se describieron las γ y δ -EXP. Las γ -EXP están presentes en *Arabidopsis*, son significativamente más cortas que las α y las β -EXP y carecen de la mayor parte del extremo carboxi terminal de la proteína madura (Ceccardi et al., 1998). Las δ -EXP no se encuentran en *Arabidopsis* y aún no se han definido sus roles, al parecer podrían representar un subgrupo específico que recientemente ha divergido de las subfamilias α y las β , siendo las γ y δ -EXP versiones truncas de las α y las β (Li et al., 2003). En halófitos como *S. maritima* (Sahu & Shaw, 2009), *Suaeda glauca* (Jin et al., 2016) y *Zea mays* (Sabirzhanova et al., 2005; Pitann et al., 2009), la sobreexpresión de los genes de β -EXPs y la concentración de estas proteínas aumentó en correlación directa con la tolerancia a estrés salino.

2.3 Las plantas halófitas

De acuerdo con Flowers y Colmer (2008), los halófitos, aproximadamente el 1 % de la flora mundial, son aquellas plantas capaces de sobrevivir y reproducirse en ambientes donde la concentración de sal (NaCl) es arriba de 200 mM y aunque todas las plantas a través del tiempo han desarrollado mecanismos de tolerancia a diferentes tipos de estrés, sólo las halófitas pueden sobrevivir y crecer en extrema salinidad (Koiwa et al., 2006) ya que llevan a cabo mecanismos que les ayudan a disminuir los efectos adversos causados por este tipo de estrés (Cherian & Reddy 2003; Askari et al., 2006; Yu et al., 2011); es por esto que representan un excelente modelo para el estudio de los procesos de tolerancia a salinidad y son fuentes potenciales de genes de resistencia para plantas de cultivo convencionales.

2.3.1 El género *Suaeda*

Aunque las diferencias entre glicófitos y halófitos manifiestan lo arbitrario de las definiciones, se ha reconocido que existen halófitos suculentos que son “altamente tolerantes” a la sal en la familia de las Amarantáceas, destacando las especies de los géneros *Suaeda* y *Salicornia* por su participación en la agricultura salina (Rozema &

Flowers, 2008; Glenn et al., 2013; Rozema & Schat, 2013; Ventura & Sagi, 2013). Particularmente el género *Suaeda* Forssk. ex Scop., con alrededor de 110 especies en su mayoría halófitos obligados, puede diluir la sal en sus hojas suculentas o en sus raíces y se han identificado especies con propiedades importantes para contribuir con la solución de los problemas derivados de la escasez de agua dulce y de tierras salinas, ya que por su adaptación a salinidad algunas especies del género pueden utilizarse como restauradoras (Zhao, 1991; Shabala, 2013) y como modelos para análisis de genes de respuesta a estrés salino.

El género *Suaeda* pertenece a la subfamilia Suaedoidae Ulbr. de la familia Chenopodiaceae (Schütze et al., 2003); generalmente crecen en zonas húmedas salinas o alcalinas y tiene una distribución cosmopolita en la costa del mar. El género comprende hierbas anuales o perennes, subarborescentes y arbustos, con tallos erguidos o postrados, glabros o pubescentes, hojas sésiles o subsésiles, alternas u opuestas, enteras, carnosas, aplanadas o semiteretes a teretes, flores inconspicuas con perianto actinomorfo o zigomorfo o irregular, de cinco segmentos, verdes, suculentos, persistentes y envolviendo al fruto, 1-5 estambres, 2-5 estigmas; flores arregladas en glomérulos en las axilas de brácteas foliares comúnmente arregladas en espigas o algunas veces racimos y utrículos con pericarpo membranáceo y semillas algunas veces dimórficas (Ferren & Schenk, 2004).

2.3.1.1 *Suaeda edulis*

Noguez et al. (2013) identificaron una nueva especie de *Suaeda* sect. Brezia en el centro de México: *Suaeda edulis* Flores Oliv. & Noguez. La nueva especie se distribuye en lagos salinos de Jalisco, Michoacán, Estado de México, Distrito Federal, Tlaxcala, Puebla y Guanajuato; específicamente ha sido encontrada en el municipio Valle de Santiago, Gto., en el Cráter-lago Hoya Rincón de Paranguero, un cráter con afloramientos rocosos, ígneos y vegetación de bosque tropical caducifolio y con regiones de suelo sódico-salino. Este tipo de suelo se forma debido a la acumulación de NaCl y carbonato de sodio (Na_2CO_3) / bicarbonato de sodio (NaHCO_3). La hidrólisis de Na_2CO_3 / NaHCO_3 en suelo salino-alcálico eleva el pH a más de 9.0 (Wang et al., 2004), y las plantas soportan solución salina y álcali concomitante (pH alto) y sufren niveles de estrés más severos que cuando se cultivan solo suelo salino (NaCl). Por algún tiempo, *S. edulis* fue confundida con *Suaeda nigra* y con *Suaeda mexicana*, pero en realidad también es muy parecida a *Suaeda calceoliformis* y se caracteriza por ser

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

una hierba anual, erecta a ascendente y uno a tres segmentos del perianto con alargamientos apicales como cornículos. Cada planta presenta de 1 a 5 flores dispuestas en glomérulos axilares o espigas terminales y axilares; las flores tienen de 2 a 3 estambres. Las semillas son de 0.9-1.6 mm de diámetro y el número cromosómico es de $2n = 54$.

2.4 El cultivo *in vitro* de plantas halófitas

S. edulis habita un lago-cráter que está siendo destruido poco a poco, al igual que su flora, debido a que es una zona turística libre. La micropropagación *in vitro* puede ser una vía importante de participación en la conservación de especies; de ser necesario, podría plantearse repoblar zonas valiosas, pues la propagación *in vitro* es una herramienta biotecnológica que ya se ha utilizado para la restauración de poblaciones naturales, ya que este tipo de técnicas tienen el potencial de producir un gran número de plantas en tiempos cortos y en espacios pequeños, lo que además permite contar con ejemplares vegetales en un laboratorio, sin tener que irrumpir ambientes naturales y con la posibilidad de proporcionar a la planta nutrientes y reguladores de crecimiento específicos de acuerdo a los intereses en los proyectos de investigación. Particularmente, en este trabajo el cultivo *in vitro* nos ha permitido generar plantas libres de las sales y el sodio de su medio natural.

3. JUSTIFICACIÓN

La salinidad es el principal estrés abiótico que afecta la productividad de las plantas en el mundo, muchas especies importantes para la alimentación humana y de ganado son afectadas por este tipo de estrés, causando gradualmente el decline en la productividad de los cultivos mediante un déficit de agua y nutrientes, reducción en la tasa de crecimiento, toxicidad iónica e incluso cambios metabólicos que causan graves daños molecular en la planta. Se han realizado numerosas investigaciones sobre la tolerancia de las plantas a diferentes tipos de estrés, sin embargo, investigaciones relacionadas con la resistencia a salinidad permanecen elusivas, principalmente porque éste es un proceso que involucra muchos aspectos fisiológicos y su

coordinación con varias rutas metabólicas donde interviene la expresión de diferentes genes.

Suaeda edulis es una planta halofita que habita el cráter Rincón de Parangueo, Valle de Santiago, Guanajuato Méxco. Sin embargo, al ser área turística está siendo poco a poco destruída. La propagación *in vitro* de esta planta puede ser una vía significativa para su conservación, y generar plantas libres de sales y sodio de su medio natural y luego compararlas con plantas de su especie provenientes del cráter. Una de las ventajas de estudiar a estas plantas halófitas es que sus genes relacionados con la resistencia o tolerancia a la salinidad dan mayor protección contra estos factores cuando son transferidos mediante ingeniería genética a plantas de interés agrícola que aquellos genes de plantas glicófitas. Entre estos se encuentran los que están involucrados en la síntesis de la GB tales como *SAMS*, *PEAMT*, *CMO* y *BADH*, en la síntesis de Pro como *P5CS*, en la compartimentalización del Na⁺ en las vacuolas como los genes *VP*, un gen codificante de un factor de transcripción asociado al estímulo de genes de respuesta a salinidad: *DREB2*, un gen codificante de una proteína intrínseca de tonoplasto: *TIP*, un gen codificante de una acuaporina y gen codificante de una expansina: α -*EXP4*.

Por tal motivo, es importante identificar y realizar estudios bioinformáticos y de expresión de estos genes que le permiten a la planta llevar a cabo su ciclo de vida tolerando el elevado pH del suelo y la alta concentración de sales que caracteriza el hábitat de *S. edulis*, ya que proporcionará información importante sobre la resistencia de las plantas a la salinidad.

4. HIPÓTESIS

Si varias plantas halófitas se han propagado *in vitro*, entonces *Suaeda edulis* que es una planta halofita podrá propagarse de esta manera.

Si las plantas halófitas logran crecer bajo concentraciones elevadas de salinidad por el efecto de varios genes asociados con respuestas adaptativas, entonces estos genes podrían mostrar cambios en su expresión en *Suaeda edulis* como respuesta a la salinidad de su hábitat.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Propagar *in vitro* *Sueada edulis*, e identificar, caracterizar y analizar la expresión de algunos genes implicados en la respuesta a salinidad en esta planta.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer un protocolo para la propagación masiva *in vitro* de *S. edulis*.
2. Identificar la presencia de los genes *SAMS*, *PEAMT*, *CMO*, *BADH*, *P5CS*, *VP*, *DREB2*, *TIP*, *APX* y α -*EXP4* en *S. edulis*.
3. Analizar mediante métodos bioinformáticos y filogenéticos las secuencias de los genes aislados de *S. edulis*.
4. Analizar y comparar la expresión de los genes de interés en raíces y hojas de plantas crecidas en su hábitat natural contra las crecidas *in vitro*.
5. Realizar una librería de cDNA a partir de hojas de plantas crecidas en su hábitat natural.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Colecta de la planta y verificación taxonómica

Muestras de *S. edulis* fueron colectadas de Hoya Rincón de Parangueo (Latitud N: 20° 25' 21", 20° 27' 57" Longitud W: 101° 12' 32", 101° 16' 30") en Guanajuato (Figura 3a,b). La planta fue tomada directamente de suelo salino con ayuda de palas y picos para sacarla cuidadosamente desde la raíz. Las plantas completas fueron colocadas cada una en una bolsa contenedora para vivero y luego trasladadas al laboratorio.

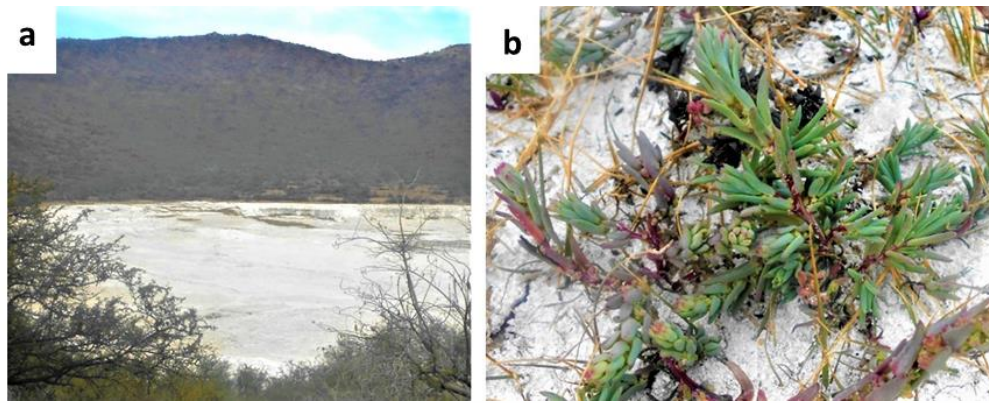


Figura 3. Hoya Rincón de Parangueo en Valle de Santiago, Guanajuato, Mex. a) Vista panorámica del cráter b) Muestra de *S. edulis* en su hábitat natural.

El material fue dividido en cuatro secciones, la primera sección fue asignada para la identificación taxonómica; la segunda sección fue utilizada para establecer los protocolos de cultivo *in vitro* de la planta y para estandarizar metodologías de extracción de ADN y ARN, síntesis de cDNA, elaboración de genoteca y amplificaciones por PCR. La tercera parte del material vegetal y muestras del suelo salino, fueron enviadas al Laboratorio de Análisis de Suelo, Agua y Nutrientes Vegetales de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (UAA) para ser analizadas por cromatografía de gases. La última parte del material vegetal fue enviada al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la UAA para obtener micrografías electrónicas de los estomas de *S. edulis* proveniente del cráter y de cultivos *in vitro*.

Para la identificación taxonómica se consideraron las características especificadas por Noguez et al. (2013), y la orientación personal de la Dra. Hilda Flores Olivera quien estuvo a cargo de la investigación mencionada.

La identificación molecular y el análisis filogenético de *S. edulis* se realizó mediante la amplificación por PCR del espaciador interno transcrito (ITS) ribosómico nuclear, utilizando 5 μ l de Buffer PCR 5X, 2.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de cada dNTP, 0.4 μ M de cada iniciador, 1.25 U de Taq ADN Polimerasa y 20 a 30 ng de ADN en un volumen final de 25 μ L. El programa de amplificación fue el siguiente: una desnaturalización inicial de 94 $^{\circ}C$ por 2 min; seguido por 35 ciclos de 94 $^{\circ}C$ por 1 min, 55 $^{\circ}C$ por 1 min y 72 $^{\circ}C$ por 1 min; y una extensión final a 75 $^{\circ}C$ por 5 min. Los amplicones fueron separados en un gel de agarosa al 0.8 % en Tris-Acetato-EDTA

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(TAE) 1X y luego purificados con el kit de extracción Wizard R® SV Gel and PCR Clean-Up System de acuerdo al protocolo de manufactura y posteriormente fueron enviadas para su secuenciación al Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LANBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICyT).

Las secuencias fueron analizadas en el programa BlastX del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para su identificación. Con estos datos se realizó un análisis filogenético de máxima parsimonia en MEGA7 mostrando el consenso de los siete árboles más parsimoniosos.

El análisis incluyó 170 secuencias de nucleótidos de especies del género *Suaeda*: *S. arctica*, *S. heteróptera*, *S. acuminata*, *S. calceoliformis*, *S. corniculata*, *S. cucullata*, *S. crassifolia*, *S. edulis*, *S. esteroa*, *S. gracilis*, *S. iranica*, *S. jacoensis*, *S. jacutica*, *S. kulundensis*, *S. linearis*, *S. maritima*, *S. mexicana*, *S. occidentalis*, *S. olufsenii*, *S. pannonica*, *S. patagonica*, *S. prostrata*, *S. puertopenascoa*, *S. pulvinata*, *S. rolandii*, *S. salsa*, *S. sibirica*, *S. tibetica*, *S. tuvinica*, *S. spicata*. Se eliminaron todas las posiciones que contenían vacíos y datos perdidos. Hubo un total de 368 posiciones en el conjunto de datos final.

6.2 Análisis del suelo del cráter y de la raíz y follaje de la planta

Muestras del suelo del cráter, y de raíz y follaje de *S. edulis*, fueron enviadas al Laboratorio de Análisis de Suelo, Agua y Nutrientes Vegetales de la UAA para ser analizados y determinar los minerales presentes.

6.3 Establecimiento in vitro de la planta

De las plantas colectadas fueron tomados fragmentos de tallos, hojas, tejido vegetativo y tejido reproductivo de aproximadamente 3 cm. Estos segmentos fueron enjuagados con agua corriente y luego fueron colocados en un vaso de precipitado en agitación para realizar los lavados correspondientes.

6.3.1 Desinfección del material vegetal

Se siguieron dos métodos de desinfección para buscar el de mejores resultados. En el primer método los fragmentos fueron lavados con agua destilada estéril más tween-20 y detergente Antibenzil® (cloruro de benzalconio) al 20 % durante 10 min y luego enjuagados en agua destilada estéril durante 1 min; después fueron lavados en etanol al 70 % durante 3 min y luego enjuagados con agua destilada estéril durante 1 min; luego fueron colocados en una solución de hipoclorito de sodio al 1 % durante 10 min, enjuagados con agua destilada por 1 min y después en una solución de mycrodin® (plata coloidal) durante 10 min. Finalmente los fragmentos fueron enjuagados en agua destilada estéril durante 1 min.

En el segundo método los fragmentos fueron lavados con agua destilada estéril más tween-20 y detergente Antibenzil® (cloruro de benzalconio) al 20 % durante 10 min y luego enjuagados en agua destilada estéril durante 1 min; después fueron lavados en etanol al 70 % sólo durante 30 seg y luego enjuagados con agua destilada estéril durante 1 min; luego fueron colocados en una solución de hipoclorito de sodio al 1 %, esta vez junto con la solución de mycrodin® (plata coloidal) durante 10 min y luego enjuagados con agua destilada por 1 min.

6.3.2 Elección del tipo de explante

Para elegir la parte de la planta que mejores resultados diera al establecerse y micropropagarse, fueron realizadas pruebas por separado utilizando tallos jóvenes de 1-1.5 cm de longitud, hojas con cortes en los extremos, tejido vegetativo y meristemas de tejido reproductivo de 1 a 1.5 cm de longitud.

6.3.3 Preparación del medio de cultivo

Medio de cultivo MS (Murashige & Skoog, 1962) fue preparado en su forma sólida agregando: a) 1 mg/mL BA, a pH de 5.7 como lo indica el método y a pH de 8 considerando el elevado pH del suelo en donde crece la planta; y b) 2 mg/mL de carbón activado a pH de 5.7 y de 8.

6.5 Identificación de los genes *SAMS*, *PEAMT*, *CMO*, *BADH*, *P5CS*, *VP*, *DREB2*, *TIP*, *APX* y α -*EXP4* en *S. edulis*

Para la identificación de los genes se tomaron en cuenta aquellos que están involucrados en la síntesis de GB: *SAMS*, *PEAMT*, *CMO*, *BADH*; en la síntesis de Pro: *P5CS*; en la compartimentalización del Na⁺ en la vacuolas: *VP*, en algunas modificaciones a la pared celular: *APX* y α -*EXP2*; y en la inducción de la transcripción de genes de respuesta a sal: *DREB2*.

Para determinar la presencia de estos genes en *S. edulis* se estandarizó la técnica de extracción de DNA total de la planta, y con iniciadores específicos dirigidos a estos genes se buscaron las mejores condiciones para la amplificación de cada uno de ellos por PCR de acuerdo con lo siguiente:

6.5.1 Extracción de ADN

Para establecer las condiciones óptimas de extracción se probaron cuatro métodos diferentes. El primero fue el protocolo de extracción de ADN establecido en el laboratorio de trabajo, para lo cual se pulverizó la planta en un mortero, se adicionó nitrógeno líquido, se trituro hasta polvo fino y luego éste fue colocado en tubos de 1.5 mL (Eppendorf®). Enseguida se adicionó el buffer de lisis (SDS 10 %, NaCl 5M, TrisCl 1mM, EDTA 0.5 M) en proporción 1:1 a cada tubo con tejido pulverizado y luego se agregaron 250 μ L de NaCl 1.4 M. Los tubos fueron agitados manualmente y colocados 10 min en hielo. Enseguida las muestras se centrifugaron durante 10 min a 12 000 rpm y la fase superior fue colocada en un tubo nuevo de 1.5 mL (Eppendorf®) al cuál se le agregó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y enseguida se agitó manualmente hasta homogenizar la muestra. Luego las muestras fueron centrifugadas durante 5 min a 12 000 rpm. La fase superior fue colocada en un tubo nuevo y se agregó un volumen de isopropanol y 1/9 de acetato de sodio 3 M. Enseguida los tubos fueron mezclados por inversión e incubados durante 10 min a temperatura ambiente. Para colectar el ADN en la base del tubo, la mezcla se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min y el sobrenadante se eliminó con una pipeta. El ADN se lavó dos veces con etanol al 70 % y la pastilla se dejó secar. Finalmente fue resuspendida en 30 μ L de agua estéril.

El segundo método se llevó a cabo siguiendo el protocolo anterior pero se agregaron 500 μ L de NaCl 1.4 50 μ L de β -mercaptoetanol.

El tercer método se realizó siguiendo el protocolo comercial de Plant/Fungi ADN Isolation (Norgen) a partir de 100 mg de tejido pulverizado en nitrógeno líquido.

El cuarto método seguido, fue el descrito por Gurudeeban et al. (2001) con ligeras modificaciones. El protocolo consistió en colocar en tubos de 1.5 mL (Eppendorf®) 500 μ L del buffer de extracción (100 mM de Tris Cl, 20 mM de EDTA, 1.4 M de NaCl, 2 % de CTAB y 0.2 % de β -mercaptoetanol) recién preparado y precalentado a 65° C, 25 mg de Polivinil polipirrolidona (PVPP) y 100 mg de tejido pulverizado en nitrógeno líquido. La mezcla formada fue homogenizada por inversión y colocada a 65° C por 30 min mezclando paulatinamente durante el tiempo de incubación. Luego se agregó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y la mezcla se incubó a temperatura ambiente por 30 min agitando paulatinamente durante el tiempo de incubación. Luego los tubos fueron centrifugados durante 15 min a 12 000 rpm y la fase superior fue transferida a un tubo nuevo con un volumen de isopropanol frío. Enseguida, los tubos fueron colocados a 20° C por 30 min y luego centrifugados durante 15 min a 12 000 rpm. La pastilla de ADN fue lavada con etanol al 70 % y una vez evaporado el etanol se agregaron 30 μ L de buffer TE y 1 μ L de RNasa. Los tubos fueron incubados a 37° C toda la noche y posteriormente se les agregó un volumen igual de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). Enseguida los tubos se centrifugaron a 8 000 rpm por 15 min y la fase acuosa fue transferida a un tubo nuevo donde además se agregó un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Los tubos fueron centrifugados durante 15 min a 12 000 rpm y la fase superior se colocó en un tubo nuevo al cuál se agregó un volumen de etanol absoluto. Considerando el volumen total final se agregó a cada tubo un décimo de acetato de amonio 7.5 N y enseguida los tubos fueron colocados a -20° C por 30 min y luego centrifugados por 15 min a 12 000 rpm. Finalmente la pastilla de ADN se dejó secar a temperatura ambiente y luego fue resuspendida en 30 mL de agua estéril.

Todas las muestras de ADN obtenidas fueron almacenadas a 4° C hasta su uso. Para verificar la cantidad e integridad del ADN, éste fue cuantificado a densidad óptica de 260/280 nm en un espectrofotómetro y visualizado en un gel de agarosa (Invitrogen) al 1 % en TAE 1X mediante tinción con bromuro de etidio.

6.5.2 Diseño de oligonucleótidos

Para poder llevar a cabo la amplificación de cada uno de los genes de interés fueron diseñados oligonucleótidos específicos utilizando varias herramientas bioinformáticas como Primer3Plus (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>), DNAMAN (<http://www.lynnon.com/dnaman.html>), Primer Select (<https://www.dnastar.com/software/molecular-biology/>), Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), a partir de una selección de secuencias previamente reportadas en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) correspondientes a distintas especies del género *Suaeda* o bien, de distintos miembros de la familia Chenopodiaceae y Amarantacea. Para el diseño de los oligonucleótidos se identificaron las regiones conservadas de cada gen para considerarlas dentro del fragmento que se amplificará. Asimismo se consideró un contenido de GC de 40 a 60 %, 19 a 24 pb de longitud, diferencias de Tm entre ambos oligonucleótidos no mayores a 1° C. Se buscó además evitar en lo posible la complementariedad entre los 2 o 3 nucleótidos del extremo 3' así como también la formación de horquillas y dímeros continuos y discontinuos.

Para los iniciadores dirigidos a *SAMS* se consideró una secuencia conservada de aminoácidos involucrada a la unión del ATP (Kamps et al., 1984) representada con el péptido GAGDQC (Van Breusegem et al., 1994; Lim et al., 2002); los géneros utilizados fueron: *Beta vulgaris*, *Carica papaya*, *Elaeagnus umbellata*, *S. salsa*, *Theobroma cacao* y *Vitis vinífera*.

Respecto *PEAMT*, éste contiene en su secuencia dos regiones que codifican para dos dominios importantes, el primero de ellos está en la posición N-terminal de la proteína. Dentro de este dominio se pueden identificar cuatro secuencias consenso (Kagan & Clarke, 1994) que cuando son removidas del gen, la enzima pierde su actividad (Charron et al., 2002). El segundo es un dominio putativo de unión a adenilmetionina (Ado-Met) y se encuentra en la porción C-terminal incluyendo también cuatro sitios conservados. La presencia de dos distintos dominios de unión a Ado-Met en la misma proteína explica su relativamente largo tamaño comparado con otras metiltransferasas (Kagan & Clarke, 1994; Ibrahim & Muzac, 2000). Los iniciadores para amplificar el gen se diseñaron a partir de la la secuencia *PEAMT* de *Suaeda japonica*, *S. liaotuningensis* y *S. maritima* considerando los motivos II, III y IV del primer sitio de unión Ado-Met.

Para la amplificación de *CMO* los iniciadores se diseñaron a partir de las secuencias *CMO* de *S. liaotungensis*, *S. maritima* y *S. salsa*; partiendo de la secuencia consenso putativa de proteínas de tipo Rieske grupo [2Fe-2S], CXHX₁₅₋₁₇CX₂H y una mononuclear no-hemo-Fe, G/DX₃₋₄DX₂HX₄₋₅H (Hibino et al., 2002). Para *BADH* los iniciadores se diseñaron a partir de las secuencias *BADH* de *S. liaotungensis*, *S. maritima* y *S. salsa*, partiendo de la región de aminoácidos VTLELGGKSP altamente conservada y un residuo cisteína característico de las deshidrogenasas (Weretilnyk & Hanson 1990; Mc Cue & Hanson, 1992; Hibino et al., 2001). Para *P5CS* los iniciadores fueron diseñados a partir de de la *P5CS* de *S. maritima*. La secuencia incluye el motivo conservado: GGPR.

Para amplificar el gen de la pirofosfatasa vacuolar, los iniciadores fueron diseñados a partir de la secuencia *VP* de *S. corniculata* los cuales incluyen el motivo TKAADVGLVGGKVE conservado en las secuencias de los géneros *Halostachys*, *Salicornia*, *Kalidium* y *Suaeda*. Para *DREB2* los iniciadores fueron diseñados a partir de las secuencias *DREB* de *S. brachiata*, *Chenopodium quinoa* y *Beta vulgaris*.

Para *TIP* los iniciadores fueron diseñados a partir de las secuencias *TIP* de *S. glauca*, *Ch. quinoa*, *Salicornia herbacea* y *S. oleracea*. Para *APX* los iniciadores fueron diseñados a partir de las secuencias *APX* de *S. salsa*, *Ch. quinoa*, *B. vulgaris*, *Camelina sinensis* y *Spinacia oleracea*. Para α -*EXP4* los iniciadores fueron diseñados a partir de las secuencias α -*EXP4* de *Ch. quinoa*, *S. oleracea*, *B. vulgaris* y *Camelina sativa*.

6.5.3 Amplificación de los genes de interés por PCR

La amplificación de los genes se realizó mediante el kit comercial GoTaq® Flexi ADN Polymerase (Promega). Los factores analizados para una mejor amplificación fueron la concentración de MgCl₂ y de los iniciadores. Para esto se realizaron gradientes de temperatura, de concentración de MgCl₂ y de iniciadores, además de pruebas con diferente número de ciclos y tiempos de amplificación para cada par de iniciadores. De esta manera, las condiciones óptimas de amplificación fueron las siguientes: una desnaturalización inicial a 94° C por 2 min, seguida de 35 ciclos de: 94° C por 1 min, 52-62° C por 1 min, 72° C por 1 min y una extensión final de 75° C durante 5 min. La T_m y las condiciones para la mezcla de reacción para cada uno de los genes se indican en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de amplificación por PCR para los genes *SAMS*, *PEAMT*, *CMO*, *BADH*, *P5CS*, *VP*, *DREB2*, *TIP*, *APX* y α -*EXP4*.

GEN	T _m ° C	MEZCLA DE REACCIÓN
<i>SAMS</i>	55	5 μ L de 5X Buffer PCR, 2.5 mM de MgCl ₂ , 0.2 mM de cada dNTP, 0.4 μ M de cada iniciador, 0.25 U de Taq ADN Polimerasa y 10 a 30 ng de ADN en un volumen final de 25 μ L.
<i>PEAMT</i>	55	
<i>CMO</i>	56	5 μ L de 5X Buffer PCR, 2.5 mM de MgCl ₂ , 0.2 mM de cada dNTP, 0.1 μ M de cada iniciador, 0.25 U de Taq ADN Polimerasa y 10 a 30 ng de ADN en un volumen final de 25 μ L.
<i>BADH</i>	58	
<i>P5CS</i>	58	5 μ L de 5X Buffer PCR, 2.5 mM de MgCl ₂ , 0.2 μ M de cada dNTP, 0.8 μ M de cada iniciador, 0.25 U de Taq ADN Polimerasa y 10 a 30 ng de ADN en un volumen final de 25 μ L.
<i>VP</i>	55	
<i>DREB2</i>	55	5 μ L de 5X Buffer PCR, 2.5 mM de MgCl ₂ , 0.2 μ M de cada dNTP, 0.8 μ M de cada iniciador, 0.25 U de Taq ADN Polimerasa y 10 a 30 ng de ADN en un volumen final de 25 μ L.
<i>TIP</i>	62	
<i>APX</i>	62	5 μ L de 5X Buffer PCR, 2.5 mM de MgCl ₂ , 0.2 μ M de cada dNTP, 0.8 μ M de cada iniciador, 0.25 U de Taq ADN Polimerasa y 10 a 30 ng de ADN en un volumen final de 25 μ L.
α - <i>EXP4</i>	60	

Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 0.8 % en Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X, teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz ultravioleta (UV). Los amplicones correspondientes a *SAMS*, *PEAMT*, *CMO*, *BADH*, *P5CS*, *VP* y *DREB2* fueron purificados con el kit de extracción Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) y enviados a secuenciación en LANBAMA-IPICyT.

Las secuencias de estos genes identificados en *S. edulis* fueron sometidas a un análisis bioinformático y nombradas *SeSAMS*, *SePEAMT*, *SeCMO*, *SeBADH*, *SeP5CS*, *SeVP* y *SeDREB2*.

6.5.4 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas

El análisis bioinformático de las secuencias obtenidas se inició con la búsqueda de secuencias homólogas en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLAST [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>] (Altschul et al., 1990). Las secuencias de aminoácidos deducidas se obtuvieron mediante “Translate tool” en Expasy Proteomics Server (<http://www.expasy.ch/>). La representación gráfica de los aminoácidos se llevó a cabo en WebLogo y la búsqueda de regiones conservadas se realizó mediante la plataforma de CDART del NCBI [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/lexington/lexington.cgi>] (Geer et al., 2002). El

modelado hipotético estructural de las secuencias de aminoácidos se realizó mediante dos programas: 1) CPHModels-3.2 [<http://www.cbs.dtu.dk/services/CPHmodels/>] para obtener el formato PDB (Nielsen et al., 2010) y 2) el programa Chimera 1.8 [<http://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>] para obtener el modelo tridimensional (Pettersen et al., 2004). Los datos fisicoquímicos de los péptidos parciales putativos se calcularon con ProtParam [<https://web.expasy.org/protparam/>]. El alineamiento múltiple se realizó en el programa UniProt (UniProt Consortium, 2016) y la filogenia en MEGA7 (Kumar et al., 2016) utilizando el método Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987); las distancias evolutivas se calcularon usando el método basado en la matriz de Dayhoff (Schwarz & Dayhoff, 1979). El porcentaje de árboles réplica en los que los taxones asociados se agruparon en la prueba de arranque (1000 réplicas) (Felsenstein, 1985) se colocó al lado de las ramas.

6.6 Análisis de expresión génica

Para realizar el análisis de expresión se tomaron cuidadosamente 3 plantas completas directamente del cráter y de tres frascos con cultivos *in vitro* de *S. edulis* para conformar así las réplicas biológicas. Las plantas fueron seccionadas por separado en raíz y hoja para llevar a cabo la extracción de mRNA y la síntesis de ADNc.

6.6.1 Extracción de ARN y síntesis de ADNc

La extracción de ARN se llevó a cabo mediante dos diferentes métodos. Para el primero de ellos se colocaron en tubos de 1.5 mL (Eppendorf®) 150 mg de tejido previamente pulverizado en nitrógeno líquido, 15 mg de PVPP y 500 µL de buffer de extracción (150 mM de Tris Borato, 50 mM de EDTA, 2 % de SDS y 1 % de β-mercaptoetanol). La mezcla fue agitada vigorosamente y luego colocada en hielo por 1min. Enseguida fueron agregados 250 µL de etanol absoluto a los tubos mezclando suavemente y luego éstos fueron colocados en hielo por 10 min. Después se agregaron 100 µL de Acetato de potasio 5 M mezclando vigorosamente y luego los tubos fueron colocados en hielo por 5 min. Enseguida se agregaron 700 µL de cloroformo:alcohol isoamílico (49:1) y las muestras fueron centrifugadas a 11 500 rpm durante 10 min; de ahí se recuperó la fase superior en tubos nuevos y se agregó un volumen de cloroformo. Los tubos fueron centrifugados a 11 500 rpm durante 15 min y la fase superior se recuperó en tubos nuevos y se agregó enseguida un volumen de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

cloroformo:alcohol isoamílico (49:1). Luego los tubos fueron centrifugados a 11 500 rpm durante 10 min y la fase superior se recuperó en tubos nuevos y se agregó enseguida un volumen de cloruro de litio 6 M y se dejó precipitar toda la noche. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 11 500 rpm durante 20 min y la pastilla de ARN fue lavada con 300 μ L de etanol al 70%. Finalmente el ARN fue disuelto en 30 μ L de agua estéril.

Para el segundo método se colocaron en tubos de 1.5 mL (Eppendorf®) 150 mg de tejido previamente pulverizado en nitrógeno líquido y se agregaron 500 μ L de PureLink® Plant RNA Reagent (Thermo Fisher Scientific), la mezcla se agitó con vortex y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Luego los tubos fueron centrifugados a 11 500 rpm durante 2 min y la fase superior fue recuperada en tubos nuevos a los cuales se les agregaron 300 μ L de cloroformo y luego fueron centrifugados a 11 500 rpm durante 10 min a 4° C; la fase superior fue recuperada en tubos nuevos y luego se agregó a cada tubo un volumen de isopropanol y se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente los tubos fueron centrifugados a 11 500 rpm durante 10 min a 4° C y la pastilla de ARN fue lavada con 1 mL de etanol al 75 %. El ARN obtenido fue diluido en 20 μ L de agua estéril.

La primera hebra de ADNc fue sintetizada a partir de 1 μ g de ARN total con 1 μ L de oligo d(T) (Invitrogen) y 1 μ L de mezcla de dNTPs 10 mM llevando el volumen total de la mezcla a 10 μ L con agua estéril. Esta mezcla fue incubada a 65° C por 5 min e inmediatamente colocada en hielo. Enseguida se agregaron 2 μ L de buffer de síntesis 5X, 4 μ L de MgCl₂, 2 μ L de DTT 0.1 M, 1 μ L de RNase OUT y 1 μ L de RT SuperScript (Invitrogen). La solución fue incubada a 50° C por 50 min y enseguida a 85° C por 5 min y luego se colocó en hielo y se agregó 1 μ L de RNase H. La reacción concluyó incubando la solución a 37 °C por 20 min.

6.6.2 Diseño de oligonucleótidos

Para llevar a cabo los análisis de expresión por tiempo real, se diseñaron nuevos oligonucleótidos a partir de las secuencias obtenidas de cada gen. Para *DREB2*, *TIP*, *APX* y *α -EXP4* se diseñaron oligonucleótidos considerando secuencias de la familia Chenopodiaceae y Amarantacea. Para amplificar el gen constitutivo *B-TUB* se utilizaron los iniciadores propuestos por Cao et al. (2016).

6.6.3 Amplificación de los genes de interés por qRT-PCR

Para amplificar los genes por qRT-PCR se utilizaron 5 μL de SYBG 2X, 0.03 μM de cada iniciador y 100 ng de ADNc en un volumen final de 10 μL ; siguiendo un programa de amplificación con un paso inicial de 50° C por 2 min seguido de 40 ciclos Δ a 95° C por 10 min, 58° C por 15 seg, 60° C por 1 min y un paso final a 95° C por 15 seg. Para normalizar la cantidad total de ADNc en cada reacción, se co-amplificó un gen de B-TUB (Cao et al. 2016) como control interno. Las muestras se trabajaron por triplicado y los datos se analizaron utilizando el software SDS del Sistema de PCR RealTime 7500 (Applied Biosystems). Los datos obtenidos fueron analizados normalizando la cuantificación relativa por el método de Livak ($2^{-\Delta\Delta C_T}$) y graficados en SigmaPlot 12.0, y luego analizados estadísticamente en Minitab v16 software (State College, PA, USA) en una prueba de ANOVA de un factor y comparación con Tukey.

6.7 Elaboración de la una librería de DNAc *S. edulis*

Para realizar la librería se utilizó la parte aérea de *S. edulis* proveniente del cráter y el kit comercial Clone Miner™ II cDNA Library Construction Kit (Invitrogen) de la siguiente manera: a una mezcla de 4 μL de agua y 1 μL Biotin-attB2-Oligo (dT) provisto en Clone Miner™ II cDNA Library Construction Kit (Invitrogen) se agregaron 25 μg de ARN obtenido como se indica en el apartado 5.5.1; enseguida el tubo de reacción se colocó en el termociclador bajo el siguiente programa: 70° C por 7 min, 68° C por 8 min, 58° C por 6 min, 48° C por 6 min y 45° C por 22 min. Luego se agregaron al tubo 4 μL de Buffer 5x First Strand Buffer, 2 μL de 0.1 M DTT y 1 μL de 10 mM dNTPs y luego se colocó el tubo a 45° C por 2 min y posteriormente se agregaron 3 μL de SuperScript® III RT y la mezcla se incubó a 45° C por 20 min seguidos por 50° C por 20 min y luego 55° C por 20 min. Una vez transcurrido todo el programa de “rampeo”, el tubo con la mezcla de reacción fue colocado en hielo y ahí se agregaron en el siguiente orden, 91 μL de agua desionizada estéril, 30 μL de 5X Second Strand Buffer, 3 μL de 10 mM dNTPs, 1 μL de *E. coli* DNA Ligase (10 U/ μL), *E. coli* DNA Polymerase (10 U/ μL) y *E. coli* RNase H (2 U/ μL).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 2 μL de T4 DNA Polymerase y el tubo fue incubado a 16° C por 5 min. Para detener la acción de la enzima fueron agregados 10 μL de EDTA 0.5 M (pH=8). Luego se agregaron 160 μL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló por vortex 30 seg, luego el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

tubo fue centrifugado a temperatura ambiente 5 min a 16,000 x g y la fase superior fue transferida a un tubo nuevo al que se agregaron también los siguientes reactivos (en ese orden y sin mezclar): 1 μL de glicógeno (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 80 μL de NH_4OAc 7.5 M y 600 μL de etanol al 100 %. El tubo fue colocado a -80°C por 10 min y luego se centrifugó a 4°C por 25 min a 16,000 x g. Enseguida la pastilla fue lavada dos veces con 150 μL de etanol al 70 % centrifugando entre lavados a 4°C por 2 min a 16,000 x g. La pastilla de ADNc se dejó secar al aire y luego fue resuspendida en 22 μL de agua desionizada estéril.

Posteriormente, el tubo se colocó en hielo y se agregaron los siguientes componentes 10 μL de Buffer 5x Adapter Buffer, 4 μL de *attB1* Adapter (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 8 μL de 0.1 M DTT y 6 μL de T4 DNA Ligase (1 U/ μL) y el la mezcla de reacción fue incubada a 16°C por 18 h y luego a 70°C por 10 min para inactivar la ligasa. Enseguida el tubo se colocó en hielo y se procedió al fraccionamiento del ADNc mediante cromatografía por columna.

6.7.2 Fraccionamiento del ADNc y reacción de recombinación

Para realizar el fraccionamiento del ADNc se utilizaron las columnas de fraccionamiento por tamaño ADNc Size Fractionation Columns (Invitrogen). Primero se tomó la columna, se le retiró la tapa superior y se eliminó el etanol que la almacena. Luego se agregaron 800 μL de buffer TEN (25 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 10 mM Tris HCl; pH 7.5) y se colectó por debajo de la columna la primera gota en un tubo eppendorf y con un cronómetro se contó a partir de la caída de la siguiente gota hasta agotar el buffer; esto se hizo para verificar la funcionalidad de la columna, ya que para poder utilizarla el tiempo entre goteo debe ser de 30 a 40 seg y el tamaño de la gota entre 25 y 35 μL . Una vez verificada la funcionalidad se lavó la columna 3 veces más con el mismo buffer TEN asegurándose de eliminar todo el buffer de la columna.

Luego al tubo con los 50 μL de muestra se agregaron 100 μL de buffer y todo fue transferido a la columna. Conforme el contenido fue saliendo de la columna se fue colectando en un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril. Al salir todo el contenido se agregaron a la columna 100 μL de buffer TEN y se colectó todo el goteo en un segundo tubo. Luego se agregaron a la columna 160 μL de buffer TEN y el goteo se colectó en un tercer tubo; después se agregaron 160 μL más de buffer TEN y el goteo se colectó en un cuarto tubo. Luego se agregaron otros 160 μL más de buffer TEN y el

goteo se colectó en un quinto tubo. Posteriormente se agregaron a la columna 80 μL de buffer TEN y el goteo se colectó en el sexto tubo.

El contenido de los tubos 3 y 4 se mezclaron y a la mezcla se agregaron 1 μL de glicógeno (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 0.5 vol de H_4OAc 7.5 M y 0.5 vol de etanol al 100 %. El tubo fue colocado a -80°C por 30 min y luego se centrifugó a 4°C por 30 min a 16,000 x g y la pastilla fue lavada dos veces con 150 μL de etanol 70 % centrifugando a 4°C por 2 min a 16,000 x g. La pastilla se secó al aire y luego se resuspendió en 6 μL de buffer TE (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA; pH=8) y se procedió a realizar la ligación.

La reacción de ligación se preparó colocando en un tubo 6 μL de *att*-ADNc , 1 μL de 150 ng/ μL pDONRTM 222 (Figura en Anexo 1), 4 μL de buffer TE y 3 μL de Gateway® BP Clonase® II y la mezcla se incubó a 25°C por 18 h. Transcurrido el tiempo de incubación se agregaron 2 μL de proteinasa K y el tubo se colocó a 37°C por 15 min y luego a 75°C por 10 min. Posteriormente se agregó agua desionizada estéril hasta ajustar a un volumen final de 100 μL . A este tubo con la ligación se agregaron 1 μL de glicógeno (20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$), 50 μL de H_4OAc 7.5 M y 375 μL de etanol al 100 % y luego la mezcla se incubó 10 min a -80°C . Luego el tubo fue centrifugado a 4°C por 25 min a 16,000 x g y la pastilla se lavó dos veces con 150 μL de etanol al 70 % centrifugando a 4°C por 2 min a 16,000 x g. La pastilla obtenida fue secada al aire y luego resuspendida en 9 μL de buffer TE.

6.7.3 Preparación y transformación de células competentes

A partir de células químicamente competentes One Shot® Top 10 (Invitrogen) fueron preparadas más células competentes, para esto a un tubo de células competentes se agregaron 200 μL de medio S.O.C. (Invitrogen) y se incubó 37°C por 36 h. De estas células se tomaron dos asadas y se colocaron en un tubo con 4 mL de medio líquido LB sin antibiótico. El tubo se dejó incubando a 37°C por 18 h y luego se tomaron 200 μL y se agregaron a otro tubo con medio líquido LB sin antibiótico. El tubo se dejó incubando a 37°C por 3 h en agitación y luego el contenido fue repartido en 5 tubos eppendorf de 1.5 mL, colocando 1 mL en cada tubo. Los tubos fueron colocados en hielo por 10 min y luego centrifugados a 4°C por 15 s a 16,000 x g. La pastilla de células fue resuspendida en 1 mL de CaCl_2 estéril y frío y los tubos fueron colocados nuevamente en hielo por 10 min y luego centrifugados a 4°C por 15 s a 16,000 x g. La

pastilla se dejó secar al aire y luego fue resuspendida en 30 μL de CaCl_2 en DMSO al 7 %. Los tubos fueron inmediatamente colocados a -80°C .

Para la reacción de transformación se agregaron 9 μL de la ligación al tubo de células competentes y luego se propició un choque térmico colocando la muestra en hielo durante 30 min seguidos de 30 seg a 42°C y colocando nuevamente en hielo. Después del choque térmico se agregaron a 250 μL de medio S.O.C. y la mezcla fue incubada a 37°C y 225 rpm durante 3 h. Posteriormente se colocó la mitad del contenido del tubo en una caja con LB y la otra mitad del tubo en otra caja (ambas placas con 50 mg/ mL de kanamicina). Las cajas fueron colocadas a 37°C por 18 h y luego cada una de las colonias se picó por separado utilizando palillos de madera estériles. Cada palillo fue colocado en un tubo con 5 mL de medio líquido LB sin antibiótico y los tubos se incubaron a 37°C por 18 h.

6.7.4 Extracción de plásmidos y análisis de rendimiento

Los transformantes que crecieron en los tubos con medio líquido se colectaron en tubos eppendorf de 1.5 mL para obtener el paquete celular (Sambrook, et al., 2001) centrifugando a temperatura ambiente por 1 min y $16,000 \times g$ hasta finalizar con los 5 mL de medio LB. A los tubos con las pastillas de células obtenidas se agregaron 100 μL de Solución I (50 mM glucosa, 25 mM Tris.HCl y 10 mM EDTA pH=8) fría, 200 μL de Solución II (0.2 N NaOH, 1 % SDS) recién preparada y 150 μL de Solución III (3 M acetato de potasio, 11.5 % Ac. Acético) fría, colocando los tubos en hielo por 5 min después de agregar cada una de las soluciones. Enseguida los tubos fueron centrifugados a 4°C por 10 min a $16,000 \times g$ y la fase superior fue transferida a un nuevo tubo, ahí se agregó un volumen de fenol:cloroformo (1:1) y luego se centrifugó a 4°C por 5 min a $16,000 \times g$. La fase superior fue transferida a un tubo nuevo y ahí se agregó un volumen de cloformo:alcohol isoamílico (49:1) y luego se centrifugó a 4°C por 5 min a $16,000 \times g$. La fase superior fue transferida a un tubo nuevo y ahí se agregó un volumen de isopropanol mezclando por inversión durante 1 min y luego se colocó a -80°C por 30 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación el tubo fue centrifugado a 4°C por 10 min a $16,000 \times g$ y la pastilla obtenida se lavó dos veces con 500 μL de etanol al 70 % centrifugando a 4°C por 5 min a $16,000 \times g$. La pastilla se dejó secar al aire y luego fue resuspendida en 20 μL de agua desionizada estéril con 0.5 μL de RNasa. Los tubos se incubaron a 37°C por 30 min y luego fueron almacenados a 4°C hasta su uso.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Los plásmidos fueron analizados en un gel de agarosa al 0.8 % en Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X y luego visualizados mediante tinción con bromuro de etidio. La genoteca se guardó en el laboratorio a -80° C hasta que se requiera su secuenciación.

Para analizar los resultados de la genoteca se realizaron tres diferentes pruebas, la primera de ellas consistió en amplificar por separado el ADN plasmídico obtenido de cada una de las colonias obtenidas en la genoteca con los iniciadores indicados en el Kit: **M13 Forward** (-20): 5'-GTAAAACGACGGCCAG-3' (primer próximo a *attL1*) y **M13 Reverse**: 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (primer próximo a *attL2*).

La segunda prueba consistió en tomar una muestra de cada una de las colonias obtenida en la genoteca picándolas con un palillo de madera estéril y enjuagando cada uno de los palillos en un mismo tubo con 10 mL de medio LB sin antibiótico. Enseguida este tubo fue incubado a 37° C por 18 h y una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó la extracción de plásmidos como se explicó en el apartado 6.7.5. El ADN plasmídico representando la genoteca completa fue utilizado como templado en reacciones de PCR amplificando con los iniciadores **M13** y con los iniciadores dirigidos a **CMO, BADH, P5CS, SAMS, PEAMT** y **VP**.

Para la tercer prueba fueron seleccionados los plásmidos de 5 clonas elegidas al azar (26, 27, 28, 29 y 30) picando cada una de ellas con un palillo de madera estéril y enjuagando cada palillo en un mismo tubo con 10 mL de medio LB sin antibiótico. Enseguida este tubo fue incubado a 37° C por 18 h y una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó la extracción de plásmidos. El ADN plasmídico representando la mezcla de 5 clonas fue utilizado como templado en reacciones de PCR amplificando con los iniciadores **M13** y con los iniciadores dirigidos a **CMO, BADH, P5CS, SAMS, PEAMT** y **VP**.

6.4 Visualización de los estomas de la planta

Muestras de *S. edulis* colectadas del cráter y tomadas de cultivos *in vitro* fueron enviadas al Laboratorio de Microscopía Electrónica de Barrido de la UAA para obtener las primeras micrografías electrónicas de los estomas de este halófito y poder visualizar cómo se encuentran estas estructuras cuando la planta está en su hábitat natural y cuando se encuentra creciendo *in vitro*.

7. RESULTADOS

7.1 Verificación taxonómica de la planta

El fragmento amplificado con los iniciadores del *ITS* fue de aproximadamente 1100 pb (Figura 4). Con la secuencia obtenida se realizó un análisis filogenético de máxima parsimonia (Figura 5), el árbol MP se obtuvo utilizando el algoritmo Subtree-Pruning-Regrafting (SPR) con el nivel de búsqueda 0 en el que los árboles iniciales se obtuvieron mediante la adición aleatoria de secuencias (10 repeticiones). El índice de consistencia fue 0,753012 (0,728477), el índice de retención 0,974597 (0,974597), y el índice compuesto 0,733883 (0,709972) para todos los sitios de parsimonia. El porcentaje de árboles parsimoniosos en el que los taxones asociados fueron agrupados se muestran junto a las ramas; la secuencia obtenida en este estudio (Contig 1) quedó agrupada en el clado de *S. edulis* y *S. calceoliformis*, tal como lo propusieron Brand et al. (2015). Estos resultados además de los análisis taxonómicos realizados, permiten confirmar que la especie de la planta modelo de estudio es *S. edulis*.

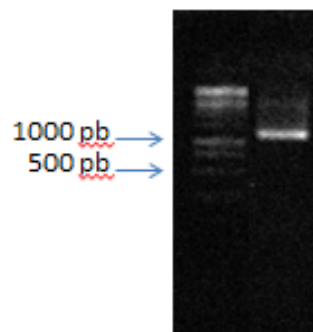


Figura 4. Amplificación ITS en ADN de *S. edulis*. En el primer carril: Ladder 1 kb ADN; en el segundo carril: amplicón ITS. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %

7.2 Componentes del suelo del cráter y de la raíz y follaje de la planta

El análisis del suelo del cráter indicó un pH de 9.2 y CE dS/m^{-1} de 4.2; las determinaciones de las sales y minerales encontrados en el suelo del cráter Rincón de Parangueo, hábitat de *S. edulis* se presentan en la Tabla 2 y las determinaciones de los minerales presentes en la parte aérea y en la raíz de *S. edulis* en la Tabla 3.

Tabla 2. Sales y minerales encontrados en el suelo del cráter Rincón de Parangueo.

	meq/L		meq/L
Calcio	0.9	Carbonatos	20.0
Magnesio	2.6	Bicarbonatos	7.0
Sodio	34.8	Cloruros	13.5
Potasio	2.3	Sulfatos	6.9
PH = 9.2		CE = 4.2 dS/m^{-1}	

Tabla 3. Minerales encontrados en la parte aérea y en la raíz de *S. edulis*.

Determinaciones	Suaeda (Aérea)	Suaeda (Raíz)
Fósforo	0.11 %	0.09 %
Potasio	1.64 %	2.0 %
Calcio	0.28 %	1.03 %
Magnesio	2.49 %	3.53 %
Sodio	80, 470.00 mg/kg	23, 610.70 mg/kg
Fierro	117.41 mg/kg	138.84 mg/kg
Manganeso	28.75 mg/kg	10.32 mg/kg
Zinc	13.66 mg/kg	21.91 mg/kg
Cobre	4.41 mg/kg	4.46 mg/kg

7.3 Establecimiento *in vitro* de *S. edulis*

El establecimiento *in vitro* de *S. edulis* se logró mediante la optimización de los métodos de para la desinfección, la preparación del medio de cultivo y en la elección del tipo de explante. Con el primer método de desinfección, los explantes se oxidaban durante el proceso (Figura 6) y no sobrevivían por más de tres días en el medio de cultivo; con el segundo método de desinfección, en el que se redujo el tiempo de exposición a los desinfectantes, se logró el 90 % de plántulas viables y libres de contaminación, lo que facilitó establecer el cultivo *in vitro* y micropropagar en el laboratorio a *S. edulis*.

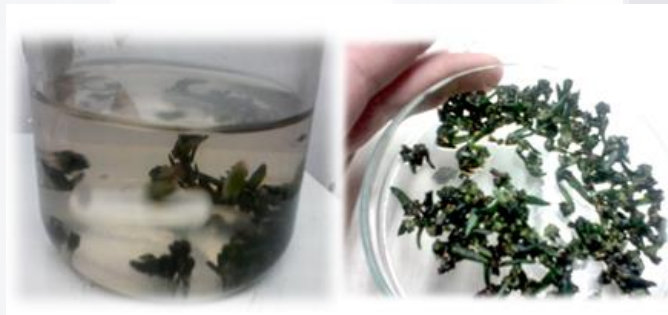


Figura 6. Explantes de *S. edulis* durante el proceso de desinfección con el Método 1. Se observa la oxidación del tejido antes de terminar el proceso de desinfección.

7.3.1 Elección del tipo de explante

Los explantes de tejido vegetativo que crecieron en medio MS a pH de 5.7 mostraron elongación de tallo y crecimiento de hojas de manera lenta pero constante a partir del cuarto día después de su siembra con la posterior oxidación de hojas senescentes y la formación de nuevos brotes entre la cuarta y quinta semana (Figura 7a). A pH de 8 se observó este mismo patrón de crecimiento, sin embargo, después de la sexta semana algunas hojas comenzaron a oxidarse y/o secarse (Figura 7b). En algunas muestras se observó la formación de tejido calloso entre la tercera y cuarta semana de siembra (Figura 7c). Estos resultados fueron constantes entre medios de cultivo con y sin adición de BA.

Respecto a los segmentos de tejido reproductivo, éstos comenzaron a secretar compuestos fenólicos pocos minutos después de haber sido colocados en el medio de cultivo, tornándose de verdes a negros y formando a su alrededor en el medio de cultivo un halo de color ligeramente rosado que se iba oscureciendo cada vez más hasta tornarse completamente negro, de tal forma que entre los 3 y 4 días de siembra el explante y todo el medio de cultivo ya se habían oscurecido (Figura 8a-c)

A partir de los explantes de hoja no hubo crecimiento alguno bajo ningún tratamiento, los extremos de las hojas donde se realizaron los cortes se oxidaron y luego permanecieron sin cambio alguno (Figura 9). A partir de tallos, la formación de escasos brotes tanto a pH de 5.7 como de 8 fue muy lenta, comenzando entre la quinta y sexta semana (Figura 10).

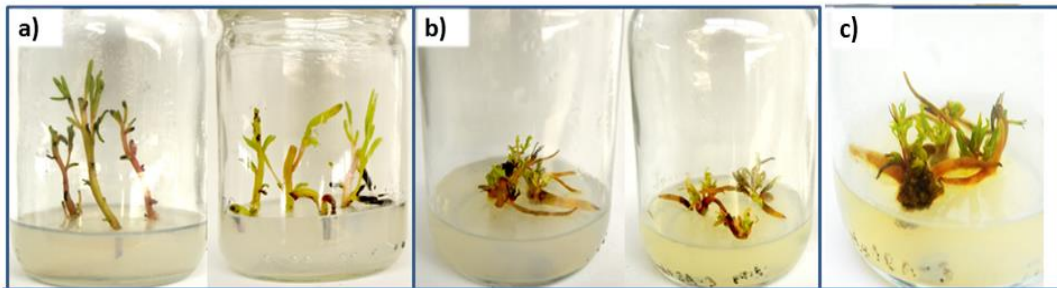


Figura 7. Explantes de tejido vegetativo de *S. edulis* en medio de cultivo MS a) Crecimiento a partir del cuarto día de siembra a pH 5.7 b) Crecimiento a partir de la sexta semana a pH 8 c) Formación de tejido calloso entre la tercera y cuarta semana.

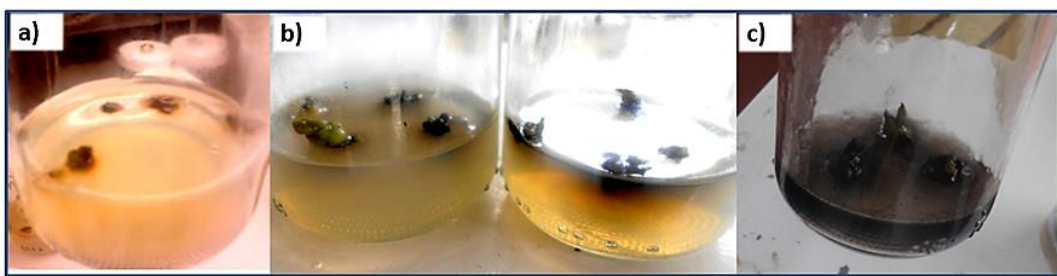


Figura 8. Explantes de tejido reproductivo de *S. edulis* en medio de cultivo MS a) Explantes después de diez minutos de ser colocados en el medio de cultivo b) Explantes después de un día de haber sido colocados en el medio de cultivo presentaron un halo ligeramente rosado c) Explantes a los cuatro días de haber sido colocados en el medio de cultivo.

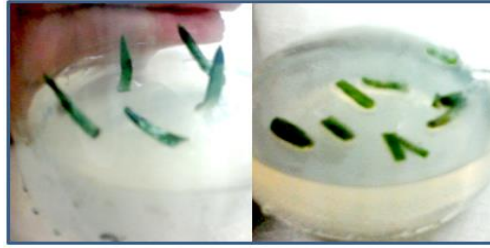


Figura 9. Explantes de hoja de *S. edulis* en medio de cultivo MS. No hubo crecimiento bajo ningún tratamiento, los extremos de las hojas donde se realizaron los cortes se oxidaron y luego permanecieron sin cambio alguno.

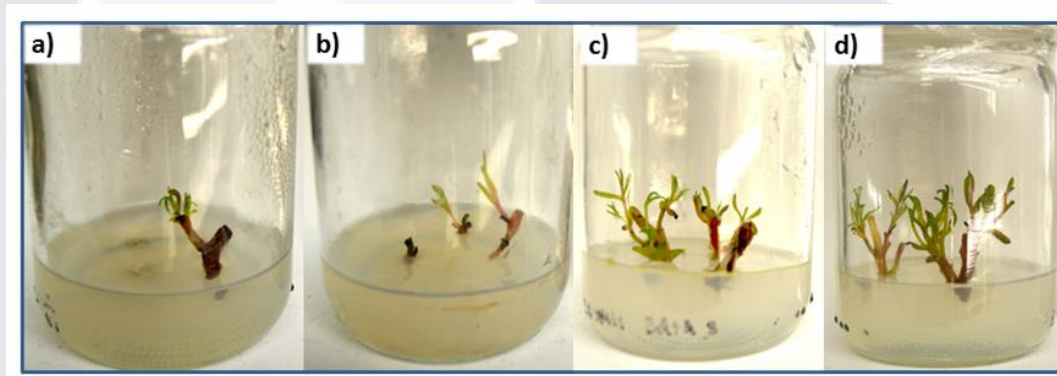


Figura 10. Explantes de tallo de *S. edulis* en medio de cultivo MS a,b) Quinta semana de crecimiento a pH 5.7 y 8 respectivamente. c,d) Décima semana de crecimiento a pH 8 y 5.7 respectivamente.

7.3.2 Desarrollo en medio con carbón activado

La adición de carbón activado en el medio de cultivo permitió un mucho mejor y más rápido crecimiento de las plántulas, así como también mayor producción de brotes (Figura 11), de tal forma que después de 3 a 4 semanas y una vez que las plántulas alcanzaron alrededor de 7 cm de altura y 3 cm de ancho fueron seccionadas en piezas de 1 a 1.5 cm de longitud, separándolas por regiones internodales con brotes axilares y colocando hasta 2 unidades en cada nuevo frasco de vidrio con MS bajo las mismas condiciones. Después de dos a tres meses las plántulas continuaron generando brotes y alrededor de 40 % generaron también raíz; todo esto sin la adición de ningún tipo de regulador de crecimiento; de esta manera se conserva a *S. edulis* en el laboratorio y se lleva a cabo su propagación continua.



Figura 11. Establecimiento y micropropagación de *S. edulis*. Medio de cultivo MS con pH 5.7 adicionado con 2 mg/mL de carbón activado. Se señalan raíz y brotes en cultivos.

7.4 Identificación de los genes *SAMS*, *PEAMT*, *CMO*, *BADH*, *P5CS*, *VP*, *DREB2*, *TIP*, *APX* y α -*EXP4* en *S. edulis*

Para el aislamiento de los genes de interés se optimizó la técnica de extracción de ADN hasta obtenerlo de buena calidad, estable y puro.

7.4.1 Extracción de ADN

Con el protocolo de extracción de ADN, establecido en el laboratorio de trabajo (Método 1) y con las modificaciones hechas al mismo (Método 2) se logró obtener ADN de la planta con concentraciones entre 3000 a 6500 ng/ μ L (cuantificado por espectrofotometría) y con funcionalidad para técnicas de biología molecular como la amplificación por PCR (verificado por la digestión con *EcoR1* y por PCR) sin embargo, el ADN presentó gran cantidad de compuestos fenólicos (Figura 12a-b).

Con el kit Plant/Fungi ADN Isolation (Método 3) no se logró la extracción de ADN estable, la electroforesis reveló un ADN degradado que no fue funcional para amplificación por PCR (Figura 12c). Con el método 4 (Gurudeeban et al., 2001) se logró obtener ADN de buena calidad, estable, con concentraciones entre 130 a 640 ng/μL funcional para técnicas moleculares y libre de contaminación por compuestos fenólicos (Figura 12d).

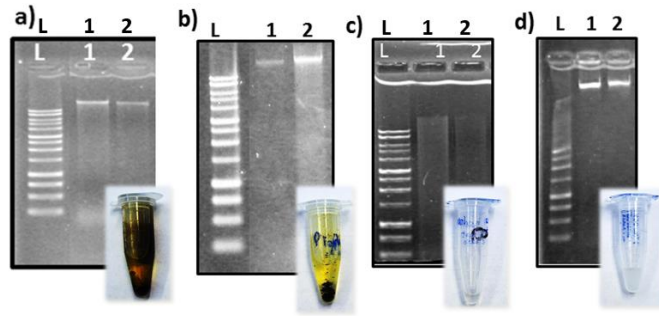


Figura 12. ADN genómico de *S. edulis*. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % Carril L= 1 kb ADN Ladder. 1 y 2 = réplicas del ADN extraído mediante los diferentes métodos. a) Método 1. b) Método 2. c) Método 3. d) Método 4.

7.5 Diseño de oligonucleótidos y amplificación por PCR

Los iniciadores diseñados se muestran en la Tabla 4. Los amplicones correspondientes a todos genes de interés en ADN de *S. edulis* se muestran en las Figuras 13 y 14.

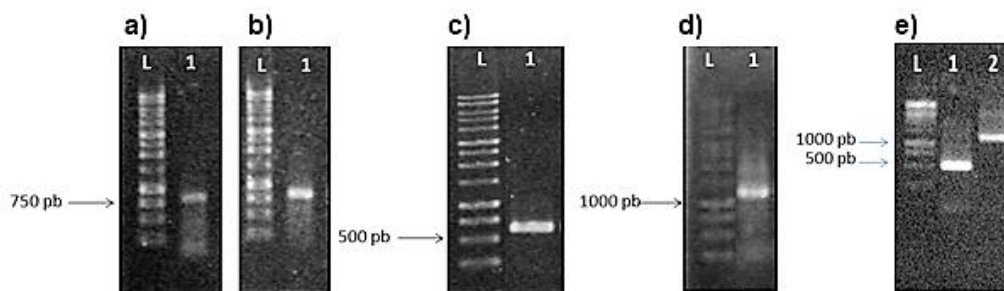


Figura 13. Amplificación de *P5CS*, *VP*, *SAMS*, *PEAMT*, *CMO* y *BADH* en ADN de *S. edulis*. L= 1 kb ADN Ladder. a) *SeP5C5* b) *SeVP* c) *SeSAMS* d) *SePEAMT* e) *SeCMO* y *SeBADH* repectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %

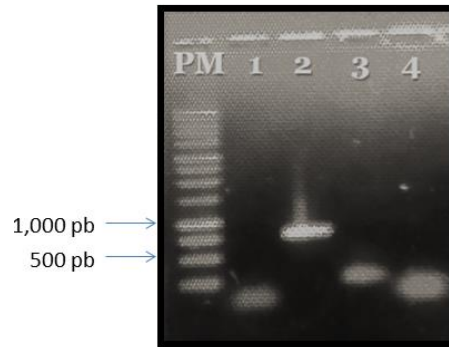


Figura 14. Amplificación de *TIP*, *DREB2*, α -*EXP4* y *APX* en ADN de *S. edulis*. PM= 1 kb ADN Ladder, del 1-4 = amplicones de los genes *TIP*, *DREB2*, α -*EXP4* y *APX* respectivamente. Electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %

Tabla 4. Oligonucleótidos iniciadores dirigidos a cada uno de los genes de interés.

GEN	INICIADORES	Fragmento amplificado (pb)
BADH	BADH-F 5'-TCT CAG GCA GCC TAT TGG TGT-3' BADH-R 5'-CAC TCT TTG CTG TCG ATA TGT AC-3'	1200
CMO	CMO-F 5'-GCA TTT CAC AAT GTT TGC ACT C' CMO-R 5'-CCT TTC CAC AGC AAA GTT GG-3'	500
PEAMT	PEAMT-F 5'-CAG GTT ATT GCT CTG GAT TTC A-3' PEAMT-R 5'-TTG TAC TGG CTA GTA TCC AGA AA-3'	1000
P5CS	P5CS-F 5' CAG TTT GGA TAT GGC GAA GCA GAT 3' P5CS-R 5' CAG CAC CCA ACC CAA AAC GAG 3'	750
SAMS	SAMS-F 5'- CAT GCA CTA AGA CTA ACA TGG TC-3' SAMS-R 5'-GAT GAC GGG CTT GAT GAC A-3'	500
VPPA	VP-F 5' ACT ATG GTG ATG ATT GGG AAG GT 3' VP-R 5' GGC CCA TAA CCC AAC AGC AA 3'	750
DREB2	DREB2-F 5'-ATA CCC TTT GAT TAC ACC AGG AA-3' DREB2-R 5'-CAT CAA ACA TTT CAT CCA TTG TT-3'	700
TIP	TIP-F 5'-GAT GGC TTT TGC CAA GCT TAC C-3' TIP-R 5'-CAG TGG TTG GTC CAG TTC CAG-3'	350
APX	APX-F 5'-AGG ATG GCA TGA TGC TGG TAC TT-3' APX-R 5'-TGG CTG CTA CAA ACT TCT CTG G-3'	400
α -EXP4	α -EXP2-F 5'-TGC TTT CAG ATA AGA TGC AAG A-3' α -EXP2-R 5'-CTT GAG CAA TGT CAG TGA TTT G-3'	450

7.5.1 Análisis bioinformático de las secuencias obtenidas

La traducción virtual y el análisis de las secuencias permitieron realizar alineamientos múltiples y secuencias logo, generar árboles filogenéticos y verificar y modelar estructuralmente las regiones conservadas de *SeSAMS*, *SePEAMT*, *SeCMO*, *SeBADH*, *SeP5C5*, *SeVP* y *SeDREB2*.

7.5.1.1 S-adenosil metionina sintetasa (SAMS)

Para *SeSAMS*, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 470 nucleótidos; la región traducida fue de 153 aminoácidos y presentó los siguientes sitios conservados, característicos de estas enzimas: a) [GN] - [AS] -G-D-Q-G-X (3) -G (Van Breusegem et al., 1994; Lim et al., 2002) involucrado en la unión de ATP (Kamps et al., 1984); b) el dominio central AdoMet_Synt_M (pfam02772); c) la región metK (TIGR01034) que es un tándem de isozimas de tipo SAMS, y d) la región nombrada COG0192 característica de las coenzimas de transporte y metabolismo.

SeSAMS mostró una similitud de 97% con la de *S. salsa* y de 91% con *Malus domestica*, entre otras (Figura 15a); la historia evolutiva de la proteína muestra una importante cercanía con SAMS de *S. salsa* (Figura 15b). Para predecir la estructura terciaria de *SeSAMS* se construyó un modelo comparativo de su estructura tridimensional y su empalme con la cadena B de la transferasa 4KTT transferasa (Figura 15c), además, la traducción virtual de la secuencia permitió determinar la representación gráfica de los aminoácidos conservados (Figura 16), en donde la altura total de la pila indica qué tanto se encuentra conservada la secuencia en esa posición, y la altura de los símbolos indica la frecuencia relativa de cada aminoácido en esa posición.

7.5.1.2 Fosfoetanolamina n-metiltransferasa (PEAMT)

Para *SePEAMT*, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 880 nucleótidos y mostró 98 % de similitud con la secuencia de PEAMT de *S. liaotungensis*, y 96 % con *S. maritima* y con *S. salsa* (Figura 170a); estas especies mostraron cercanía con *SePEAMT* de acuerdo con la historia evolutiva de la proteína (Figura 17b). Para predecir la estructura terciaria de *SePEAMT* se construyó un modelo comparativo de

su estructura tridimensional y su empalme con la cadena B de la transferasa 1XTP (Figura 17c). La traducción virtual de la secuencia permitió determinar también la representación gráfica de los aminoácidos conservados (Figura 18).

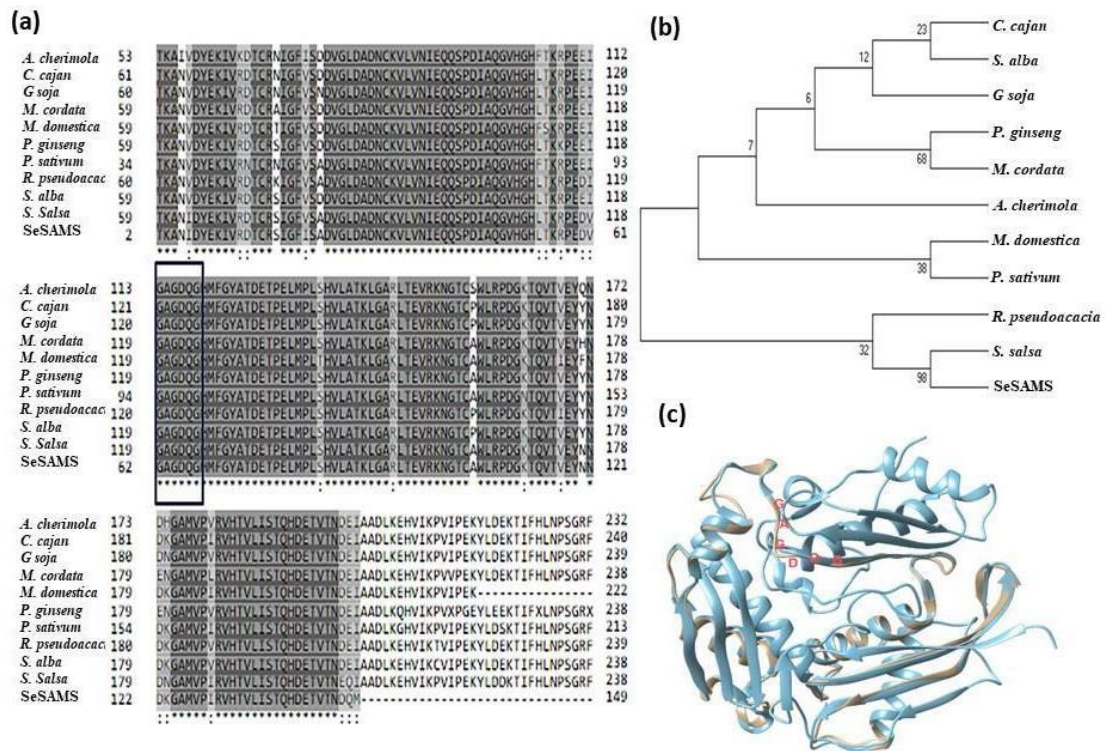


Figura 15. Alineamiento, historia evolutiva y modelado estructural hipotético de SeSAMS.
a) SeSAMS con SAMS de *Annona cherimola* ABC24692.1, *Cajanus cajan* AEY85025.1, *Glycine soja* KHN28175.1, *Macleaya cordata* OVA13537.1, *Malus domestica* BAI66450.1, *Panax ginseng* ACD92982.1, *Pisum sativum* AAA58772.1, *Robinia pseudoacacia* AIT39705.1 *Sonneratia alba* AGJ71754.1, *Suaeda salsa* AF321001.1 y *S. AAG42490.1*; los residuos de aminoácidos conservados en todas las secuencias se muestran con asteriscos, y las sustituciones conservadas se muestran con puntos. Los residuos que están asociados con el sitio de unión a ATP putativo se muestran en un recuadro. b) Relaciones evolutivas de SeSAMS con taxa, deducidas utilizando el método Neighbor-Joining con MEGA7. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.25799755. c) Dominio ProB en SeSAMS y su empalme con la cadena B de la transferasa 4KTT.

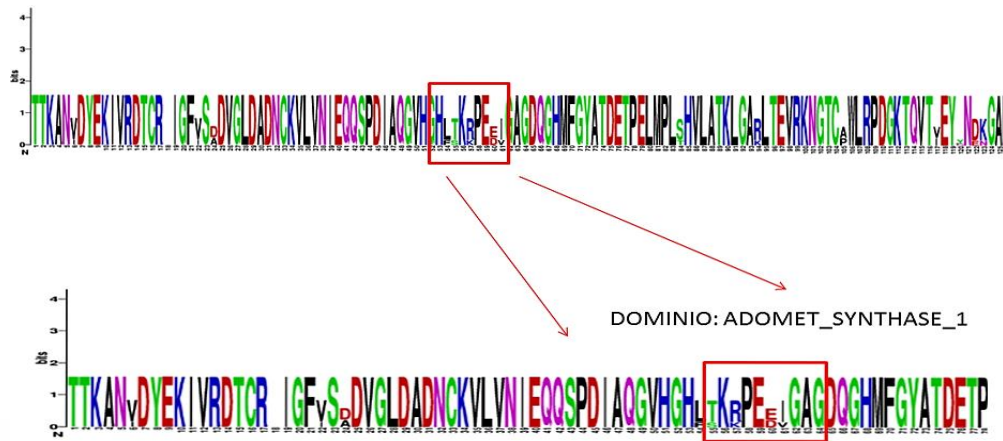


Figura 16. Representación gráfica de los aminoácidos conservados en SeSAMS. Se resalta en el recuadro la secuencia del dominio AdoMet_synthase_1.

7.5.1.3 Colina monooxigenasa (CMO)

Para SeCMO, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 456 pb, y la región traducida fue de 152 aminoácidos, dentro de los cuales se identificó la secuencia consenso putativa para la región G / DX3-4DX2HX4-5 H; la secuencia parcial de SeCMO mostró 100% de similitud con el CMO de *S. maritima* y *S. liaotungensis*, y 88% con *Salicornia europea* (Figura 19a). El análisis filogenético agrupó SeCMO con CMO de *S. liaotungensis*, aunque también mostró una cercanía evolutiva con *S. maritima* (Figura 19b). El modelo comparativo construido para predecir la estructura tridimensional de SeCMO y su empalme con la cadena A de la oxidorreductasa IWQL se muestra en la Figura 19c. La traducción virtual de la secuencia permitió además determinar la representación gráfica de los aminoácidos conservados (Figura 20).

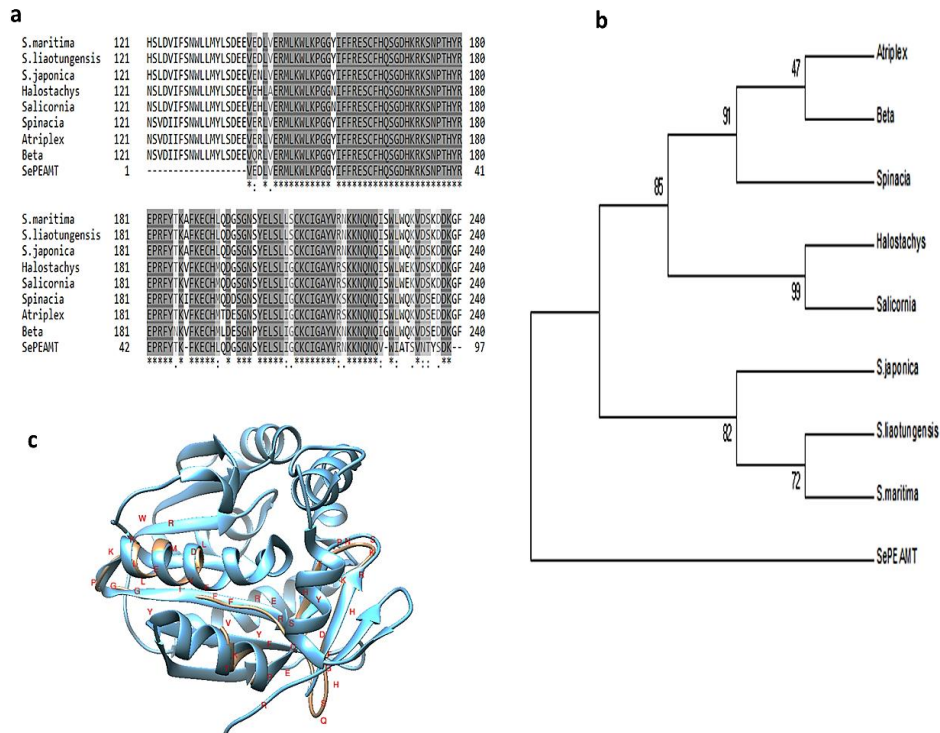


Figura 17. Alineamiento, historia evolutiva y modelado estructural hipotético de SePEAMT. a) SePEAMT con PEAMT de *Suaeda liaotungensis* ABK42071.1, *Suaeda maritima* AFW04224.1, *Suaeda japonica* BAC57432.1, *Salicornia europea* ABG57185.1, *Halostachys caspica* AHX22003.1, *Spinacia oleracea* XP_021840090.1, *Beta vulgaris* BAE07178.1, *Atriplex canescens* AEY75253.1; los residuos de aminoácidos conservados en todas las secuencias se muestran con asteriscos, y las sustituciones conservadas se muestran con puntos. b) Relaciones evolutivas de SePEAMT con taxa, deducidas utilizando el método Neighbor-Joining con MEGA7. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 0.32642117. c) Dominio PLN02336 en SePEAMT y su empalme con la cadena B de la transferasa 1XTP.

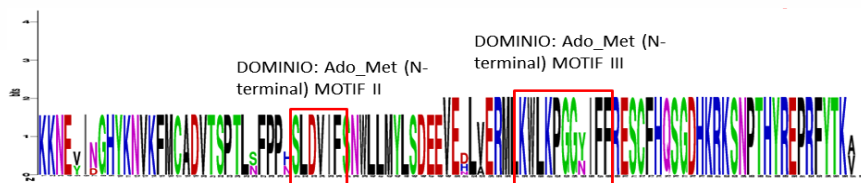


Figura 18. Representación gráfica de los aminoácidos conservados en SePEAMT. Se resalta el segundo y el tercer motif del extremo N- terminal de la secuencia de aminoácidos.

7.5.1.4 Betaína aldehído deshidrogenasa (BADH)

Para *SeBADH* se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1000 pb, de los cuáles 252 pb mostraron picos bien definidos en el electroferograma; esta secuencia mostró 91% de similitud con BADH de *S. glauca* y *S. liaotungensis* y 77 % con *S. oloracea* (Figura 21a). La historia evolutiva indicó que *SeBADH* es un subgrupo único con la BADH de *S. liaotungensis*, aunque también mostró cercanía con aquella de *S. glauca* (Figura 21b). En la región traducida de 84 aminoácidos se encontró parte del dominio ALDH, característico de la superfamilia ALDH y en la estructura tridimensional de *SeBADH* en empalme con la cadena de la BADH 5A2D se destaca el dominio ALDH (Figura 21c). La representación gráfica de los aminoácidos conservados se muestra en la Figura 22.

7.5.1.5 Δ -pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS)

Para *SeP5CS*, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 786 nucleótidos y la región codificante fue de 262 aminoácidos, entre los cuales se identificó la región glutamato 5-quinasa, característica de la superfamilia Pro-B (Figura 23c). *SeP5CS* mostró 69% de similitud con la P5CS de *S. salsa* y 61% con la de *B. vulgaris* (Figura 23a). El árbol filogenético muestra a *SeP5CS* subgrupo solo con la P5CS de *S. salsa* (Figura 23b). El modelo comparativo tridimensional de *SeP5CS* y su empalme con la 2H5G de P5CS también muestran aminoácidos conservados (Figura 23c); la representación gráfica se muestra en la Figura 24.

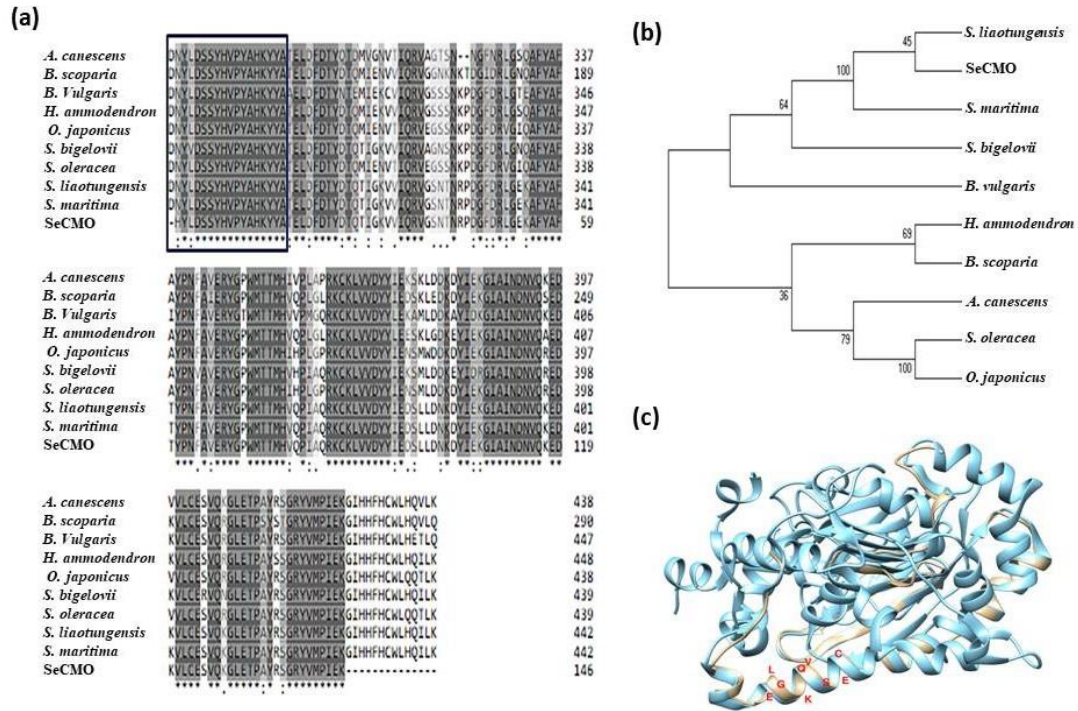


Figura 19. Alineamiento, historia evolutiva y modelado estructural hipotético de SeCMO.
 a) SeCMO con CMO de *Atriplex canescens* AFG28558.1, *Bassia scoparia* AAQ92313.1, *Beta vulgaris* BAE07177.2, *Haloxylon ammodendron* ACX47904.1, *Ophiopogon japonicus* ABG34274.1, *Salicornia bigelovii* AJF98574.1, *Spinacia oleracea* ABN43460.1, *Suaeda liaotungensis* AAM43920.1 y *Suaeda maritima* AFW04225.1; los residuos de aminoácidos conservados en todas las secuencias se muestran con asteriscos, y las sustituciones conservadas se muestran con puntos. La secuencia consenso putativa para la coordinación de Fe mononuclear no-hemo (G / DX3–4DX2HX4–5 H) se muestra en un recuadro. b) Las relaciones evolutivas de SeCMO con taxa, deducidas utilizando el método de Neighbor-Joining en MEGA7. Se muestra el árbol óptimo con la longitud de rama = 0.54709925. c) SeCMO y su empalme con la cadena A de la IWQL oxidoreductasa; ambos muestran la región conservada CESVQKGLE.

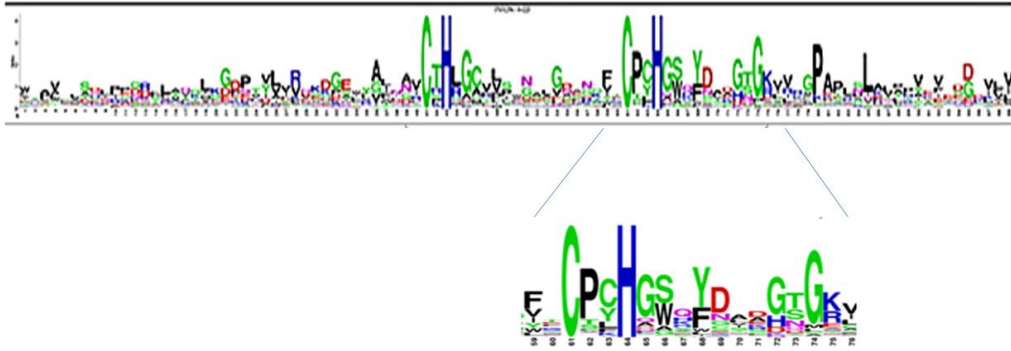


Figura 20. Representación gráfica de los aminoácidos conservados en SeCMO. La altura total de la pila indica qué tanto se encuentra conservada la secuencia en esa posición; la altura de los símbolos en la pila indica la frecuencia relativa de cada aminoácido en esa posición.

7.5.1.6 Pirofosfatasa vacuolar-A (VP)

Para *SeVP*, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 726 nucleótidos traducidos en 242 aminoácidos, entre los cuales se identificó el dominio característico de las V-PPAsas, con multidominios de tipo hppA que colocan a *SeVP* dentro de la superfamilia de las bombas transmembranales de protones, H-PPAsas, responsables de establecer la diferencia de potencial electroquímico entre el lumen de la vacuola y el citoplasma. *SeVP* mostró 94% de similitud con la secuencia de la V-PPasa de *S. corniculata* y *Kalidium foliatum* (Figura 25a). El árbol filogenético muestra la cercanía de *SeVP* con la de *S. corniculata* (Figura 25b). El modelo comparativo tridimensional *SeVP* y su empalme con la cadena A de la pirofosfatasa translocadora H1 4A01 muestran la región conservada DVGADLVGKV (Figura 25c). La representación gráfica de los aminoácidos conservados se presenta en la Figura 26.

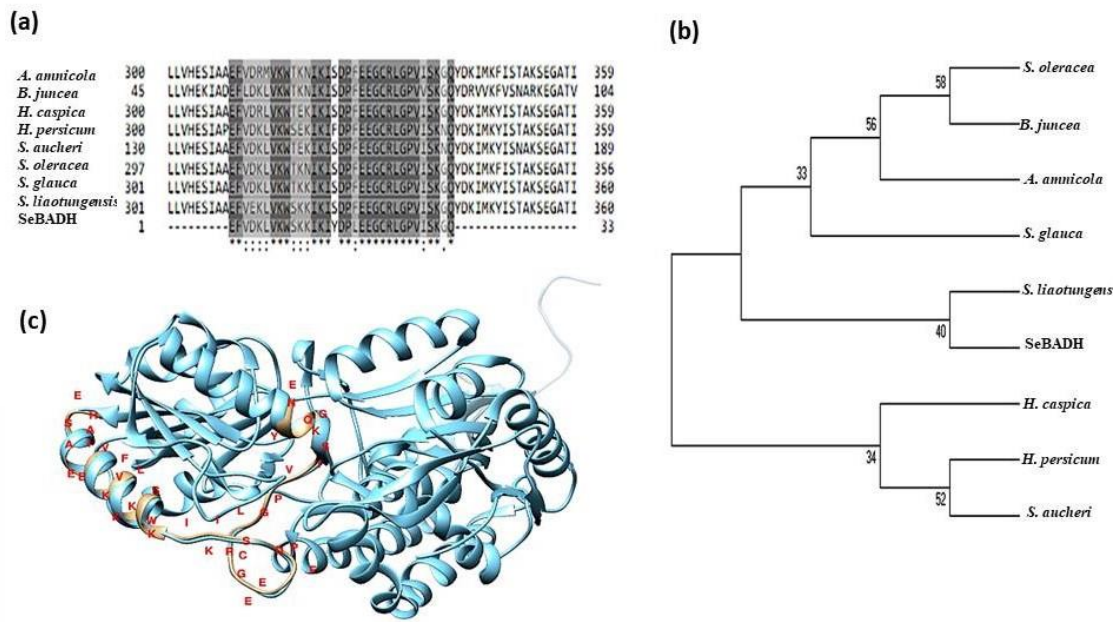


Figura 21. Alineamiento, historia evolutiva y modelado estructural hipotético de SeBADH
a) BADH from *Atriplex annicola* AHH24263, *Brassica juncea* AEX55691.1, *Halostachys caspica* ABO45931.1, *Haloxylon persicum* AEW31327.1, *Salsola aucheri* AWK59869.1, *Spinacia oleracea* AAN52929.1, *Suaeda glauca* AHB08884.1 and *Suaeda liaotungensis* AAL33906.1; los residuos de aminoácidos conservados en todas las secuencias se muestran con asteriscos, y las sustituciones conservadas se muestran con puntos. En el recuadro se destaca el dominio ALDH. b) Las relaciones evolutivas de SeBADH con los demás taxa, fueron deducidas utilizando el método de Neighbor-Joining en MEGA7. Se muestra el árbol óptimo con longitud de rama = 0.54709925. c) Dominio ALDH-SF en SeBADH and su empalme con la cadena C de la BADH 5A2D.



Figura 22. Representación gráfica de los aminoácidos conservados en SeBADH. Se muestra dominio ALDH-SF, que es el que actúa sobre sustratos aldehídos, así estas deshidrogenasas pueden catalizar la oxidación de betaína aldehído al soluto compatible GB.

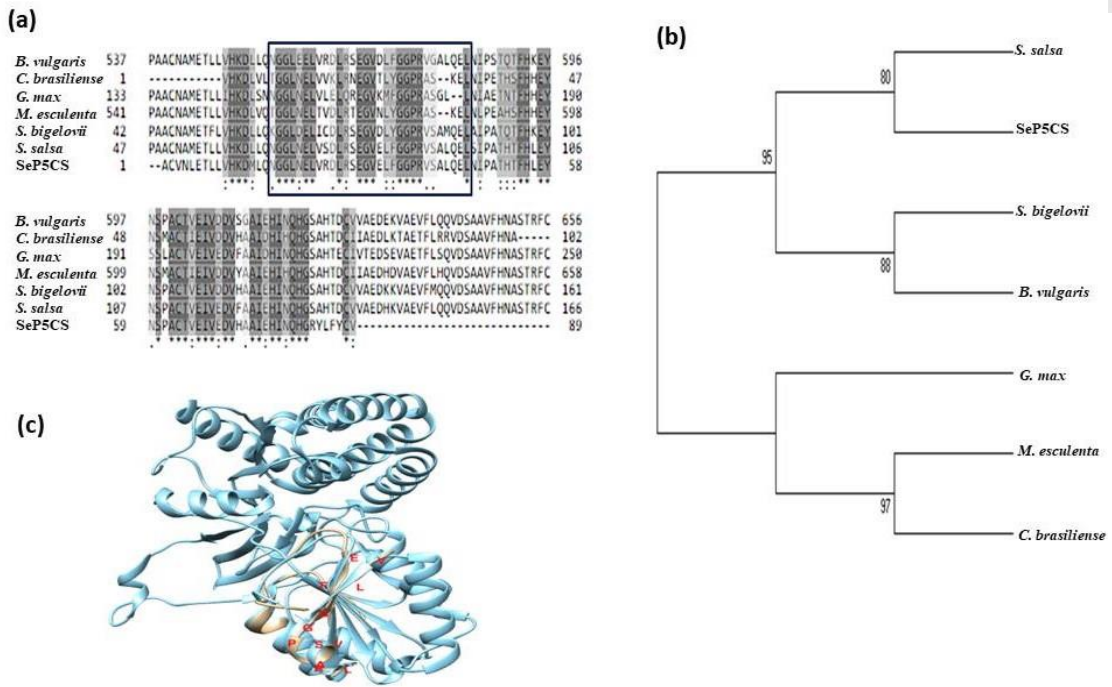


Figura 23. Alineamiento, historia evolutiva y modelado estructural hipotético de SeP5CS.

a) SeP5CS con P5CS de *Beta vulgaris* AQZ26218.1, *Calophyllum brasiliense* AHN15384.1, *Glycine max* CAG29643.1, *Manihot esculenta* ANU05021.1, *Salicornia bigelovii* AGN48983.1 and *Suaeda salsa* AAM28630.1; los residuos de aminoácidos conservados son mostrados por asteriscos y las sustituciones conservadas se señalan con puntos. El dominio putativo Leu se muestra en el recuadro. b) Las relaciones evolutivas de SeP5CS con los taxa fueron inferidos usando el método Neighbor-Joining en MEGA7. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de rama = 0.25799755. c) Empalme de SeP5CS con la P5CS molde 2H5G, destacando en ambas la región ProB.



Figura 24. Representación gráfica de los aminoácidos conservados en SeP5CS. Se destaca el dominio PLN02418, característico de las glutamato-5-quinasas.

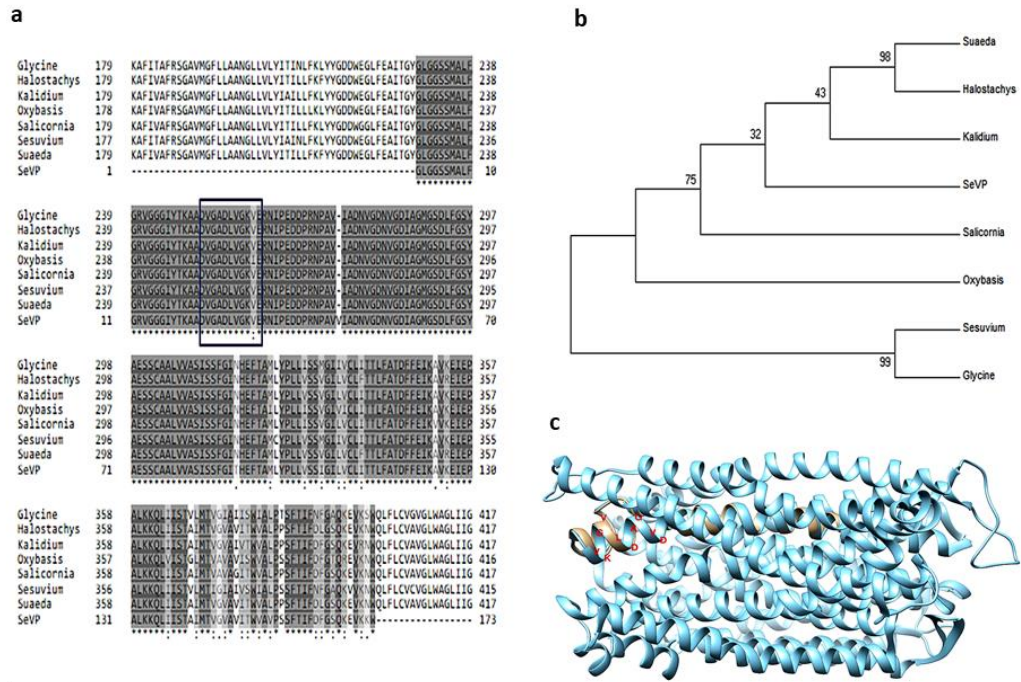


Figura 25. Alineamiento, historia evolutiva y modelado estructural hipotético de SeVP.

a) Alineamiento de SeVP con VP from *Glycine soja* KHN38003.1, *Halostachys caspica* ABO45933.1, *Kalidium foliatum* ABK91685.1, *Oxybasis glauca* ABD98735.1, *Salicornia europaea* AEI17665.1, *Sesuvium portulacastrum* ASM90228.1 y *S. corniculata* ADQ00196.1; los residuos de aminoácidos conservados son mostrados por asteriscos y las sustituciones conservadas se señalan con puntos. Un motivo catalítico, DX7KXE, se muestra en el recuadro.

b) Relación evolutiva de SeVP con los taxa, inferida usando el método Neighbor-Joining en MEGA7. Se muestra la suma de las ramas del árbol óptimo= 0.23182682. c) Dominio H-PPase de SeVP y su empalme con la cadena A de la pirofosatasa traslocadora, 4A01.

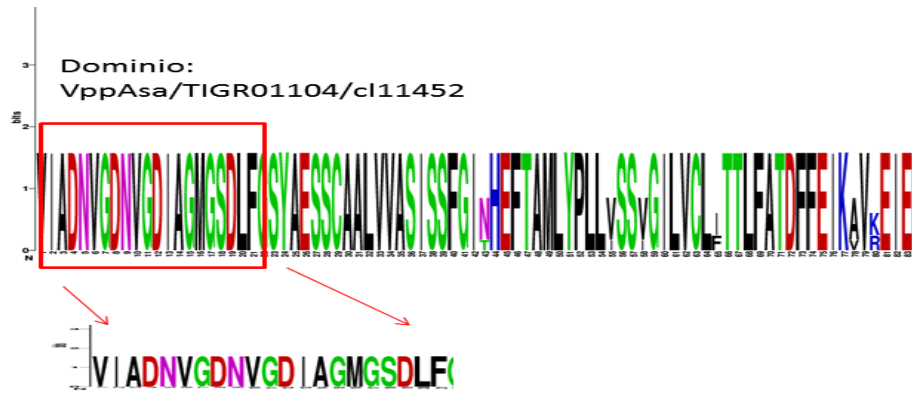


Figura 26. Representación gráfica de los aminoácidos conservados en SeVP. La altura total de la pila indica qué tanto se encuentra conservada la secuencia en esa posición; la altura de los símbolos en la pila indica la frecuencia relativa de cada aminoácido en esa posición. Se destaca el dominio VppAsa.

7.5.1.7 Proteína de unión a elementos sensibles a la deshidratación (DREB2)

Para *SeDREB2*, se obtuvo un fragmento de aproximadamente 709 nucleótidos traducidos en 236 aminoácidos con 87% de similitud con DREB de *S. brachiata* (Figura 270a); en la filogenia se puede apreciar claramente esta cercanía (Figura 27b). El modelo comparativo tridimensional *SeDREB2* y su empalme con la cadena A del dominio AP2 de *A. thaliana* 1GCC de unión a DNA se muestran en la Figura 27c. La representación gráfica de los aminoácidos conservados se presenta en la Figura 28.

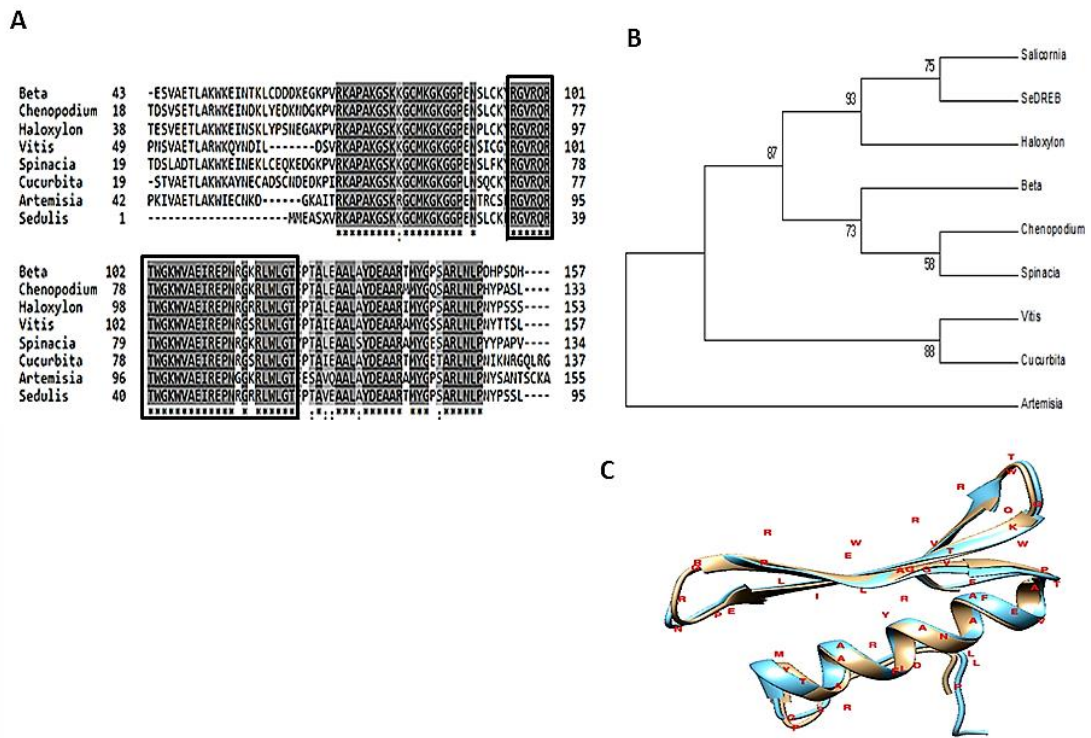


Figura 27. Alineamiento, historia evolutiva y modelado estructural hipotético de SeDREB.

a) SeDREB2 con DREB de *Salicornia brachiata* ADD92167.1, *Beta vulgaris* XP_010692919.1, *Chenopodium quinoa* XP_021769255.1, *Haloxylon ammodendron* AKU47817.1, *Vitis vinifera* RVW42400.1, *Spinacia oleracea* XP_021855823.1, *Cucurbita maxima* XP_022993155.1 y *Artemisia annua* PWA77695.1; los residuos de aminoácidos conservados en todas las secuencias se muestran con asteriscos, y las sustituciones conservadas se muestran con puntos. Los residuos que están asociados con el sitio de unión a DNA se muestran en un recuadro. b) Relaciones evolutivas de SeDREB2 con taxa, deducidas utilizando el método Neighbor-Joining con MEGA7. Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de la rama = 1.40698000. c) Empalme de los Dominios AP2 en SeDREB2 y en 1GCC de *A. thaliana*.



Figura 28. Representación gráfica de los aminoácidos conservados en SeDREB2. Se identificó el dominio AP2 de unión al DNA, presente en algunos reguladores de la transcripción en plantas.

Los parámetros fisicoquímicos de SeSAMS, SePEAMT, SeCMO, SeBADH, SeP5CS, SeVP y SeDREB2 (Tabla 5) revelaron que el único péptido básico es SeBADH y SeCMO y SeSAMS contienen en su mayoría aminoácidos hidrofílicos, mientras que SeDREB2 contiene en su mayoría aminoácidos hidrofóbicos. Sólo SeSAMS y SeVP, como péptidos parciales, son estables.

Tabla 5. Propiedades fisicoquímicas de los péptidos parciales putativos identificados en *S. edulis*

	SeBADH	SeCMO	SeP5CS	SePEAMT	SeSAMS	SeVP	SeDREB2
Punto isoelectrico teórico	8.69	5.61	5.41	5.07	5.42	4.42	5.17
GRAVY	0.110	-0.608	0.247	0.678	-0.411	0.863	0.720
Índice de inestabilidad	42.82	45.02	64.10	44.25	29.18	34.16	45.16
Índice alifático	90.85	72.55	102.97	28.40	84.61	117.76	30.47
Peso molecular (kD)	38,798.18	16,873.01	24,098.93	98,795	16,683.79	13,185.39	57,165.14

7.6 Expresión de los genes de interés en *S. edulis*

Con los dos métodos utilizados se obtuvo ARN total con concentraciones entre 50 y 120 ng/μL funcional para la síntesis de ADNc. El ADNc permitió la amplificación de los genes de interés; en la Figura 29 se muestran algunos amplicones. Los oligonucleótidos iniciadores utilizados en la amplificación por qRT-PCR se muestran en la Tabla 6.

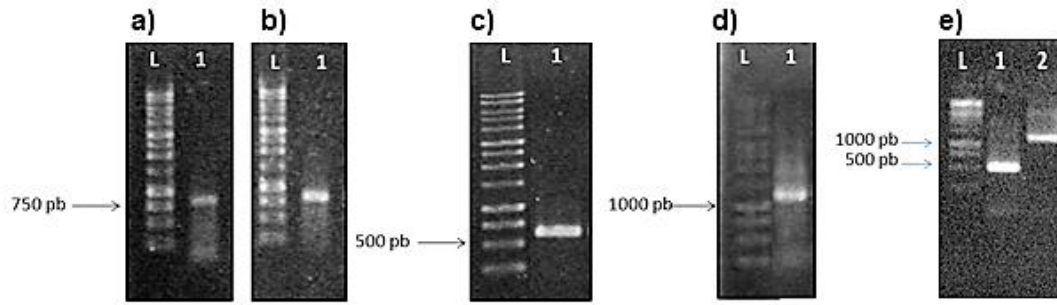


Figura 29. Amplificación de *SeP5C5*, *SeVP*, *SeSAMS*, *SePEAMT* y *SeCMO* en ADNc de *S. edulis*. L= 1 kb ADN Ladder a) *SeP5C5*, b) *SeVP*, c) *SeSAMS*, d) *SePEAMT*, e) *SeCMO*.

Tabla 6. Iniciadores para qRT-PCR diseñados a partir de las secuencias aisladas de *S. edulis*

GEN	SECUENCIA
SAMS*	Forward: 5´-AGGTAAGGAAGAATGGCACTTGT-3´ Reverse: 5´-ATTTGATCGTTGGTCACAGTCTC-3´
PEAMT*	Forward: 5´-CTTTGTTTCGTTGCAGAATG-3´ Reverse: 5´-TCTTCATCAGAAAGATACATGA-3´
CMO*	Forward: 5´-GCCGAGATGGTGAAGGAAAA-3´ Reverse: 5´-CATCAGTTGTTTGGGTGGCT-3´
BADH*	Forward: 5´-GCAGAAGCTCTGGACAACAAGC-3´ Reverse: 5´-CTCGGATGGCTTAAGTACAGCT-3´
P5CS*	Forward: 5´-GCGTTGGCAGTCATTCTTTT-3´ Reverse: 5´-TCAATGGCAGCATGAACATC-3´
VP*	Forward: 5´-GGTCTTGGAGGATCTTCCAT-3´ Reverse: 5´-TGACCAACATTCAACTGAGAAG-3´
DREB2*	Forward: 5´-TAAATTCCGAGGAGTTAGACAG-3´ Reverse: 5´-TCTTCAAACAACGATGAAGGG-3´
TIP	Forward: 5´-GATGGCTTTTGCCAAGCTTACC-3´ Reverse: 5´-CAGTGGTTGGTCCAGTTCCAG-3´
APX	Forward: 5´-AGGATGGCATGATGCTGGTACTT-3´ Reverse: 5´-TGGCTGCTACAACTTCTCTGG-3´
α-EXP4	Forward: 5´-GTGCTTGTGGGTACGGAAACT-3´ Reverse: 5´-GGAGCA ATATTCCAAGAGGTGG-3´
B-TUB**	Forward: 5´-CCTTATTCCATTCCCAGGCTTC-3´ Reverse: 5´-CATCTGCTCATCAACCTCCTTTGTGC-3´

*Diseñados a partir de las secuencias aisladas de *S. edulis*

**Reportados por Cao et al., 2016

La expresión cuantitativa de los genes involucrados en la biosíntesis de GB fue de la siguiente manera: para *SAMS* se observó una mayor expresión plantas provenientes del cráter, con respecto a las provenientes de cultivos *in vitro*, sin embargo la diferencia en expresión sólo fue estadísticamente significativa en hojas, no así en raíz. Para los genes *BADH* y *CMO* la expresión fue más elevada en las raíces y hojas de las plantas del cráter (Figura 30) con respecto a las plantas cultivadas *in vitro*. El gen *P5CS* involucrado en la biosíntesis de pro, también mostró niveles de expresión más altos en las hojas y raíces de plantas de cráter que en las de plantas *in vitro* (Figura 30).

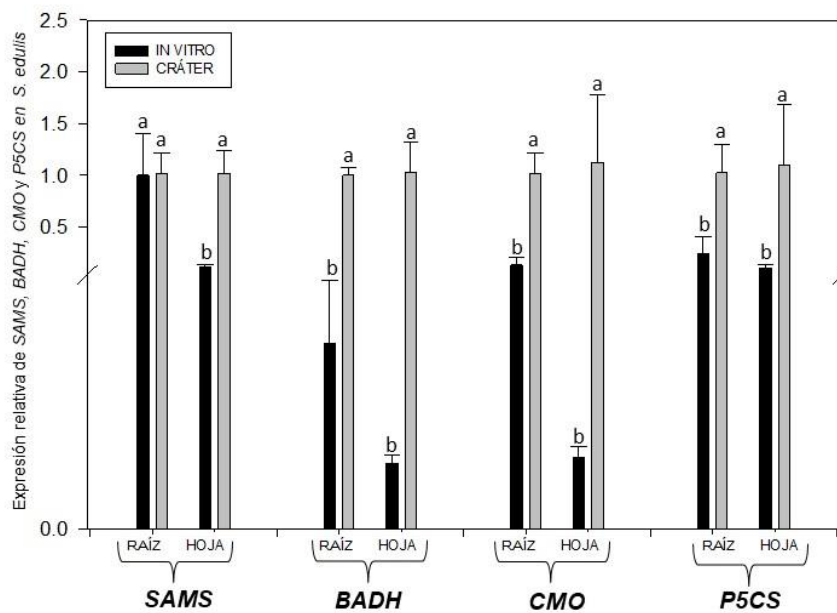


Figura 30. Expresión relativa de *SAMS*, *BADH*, *CMO* y *P5C5* en *S. edulis*. Se representan los niveles de expresión relativa de los genes en la raíz y en las hojas de *S. edulis*; las barras en color negro representan la expresión en plantas del cráter y las barras en gris representan la expresión en plantas *in vitro*. El análisis por qRT-PCR fue normalizado con el gen constitutivo de la β -*Tubulina*. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres réplicas.

El gen *VP* involucrado en el transporte de Na^+ en las vacuolas mostró mayores niveles de expresión en raíces y hojas de plantas de cráter (Figura 31); el gen *DREB2*, codificante para un factor de unión a secuencias promotoras de genes de respuesta a estrés mostró niveles de expresión estadísticamente más elevados en raíz y hojas de plantas de cráter (Figura 32).

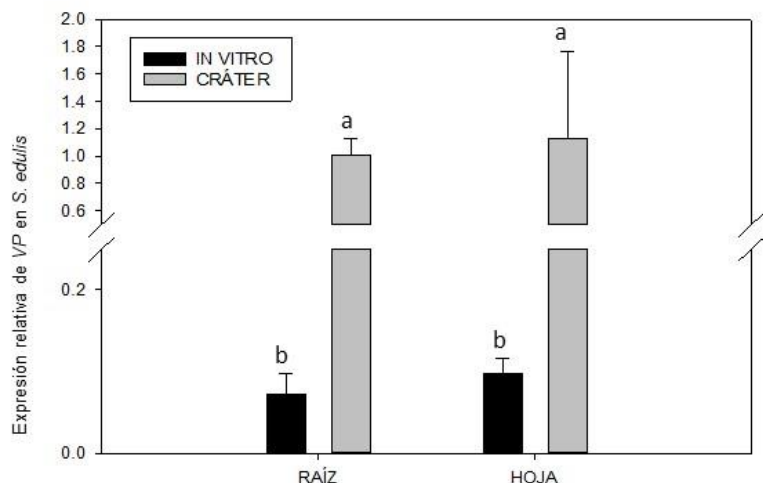


Figura 31. Expresión relativa de VP en *S. edulis*. Se representan los niveles de expresión relativa del gen en la raíz y en las hojas de *S. edulis*; las barras en color negro representan la expresión en plantas del cráter y las barras en gris representan la expresión en plantas *in vitro*. El análisis por qRT-PCR fue normalizado con el gen constitutivo de la β -Tubulina. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres réplicas.

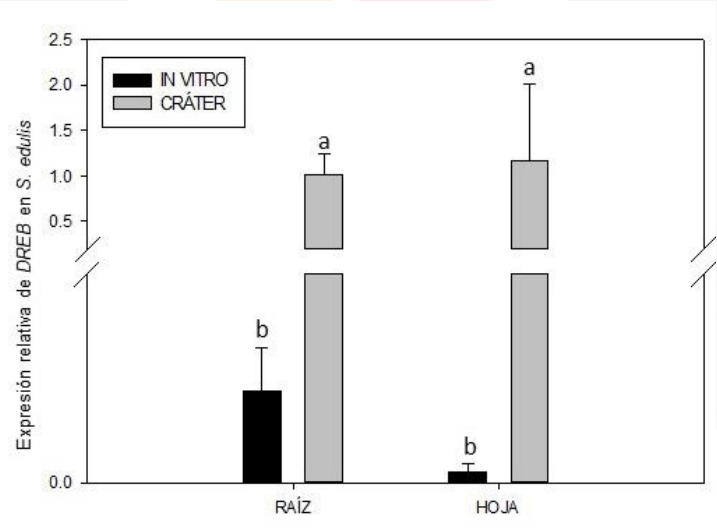


Figura 32. Expresión relativa de DREB2 en *S. edulis*. Se representan los niveles de expresión relativa del gen en la raíz y en las hojas de *S. edulis*; las barras en color negro representan la expresión en plantas del cráter y las barras en gris representan la expresión en plantas *in vitro*. El análisis por qRT-PCR fue normalizado con el gen constitutivo de la β -Tubulina. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres réplicas.

El gen *TIP*, involucrado en los procesos de transporte de agua a través de la membrana, mostró expresión ligeramente más elevada en raíces y hojas de plantas de cráter, sin embargo, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Figura 33).

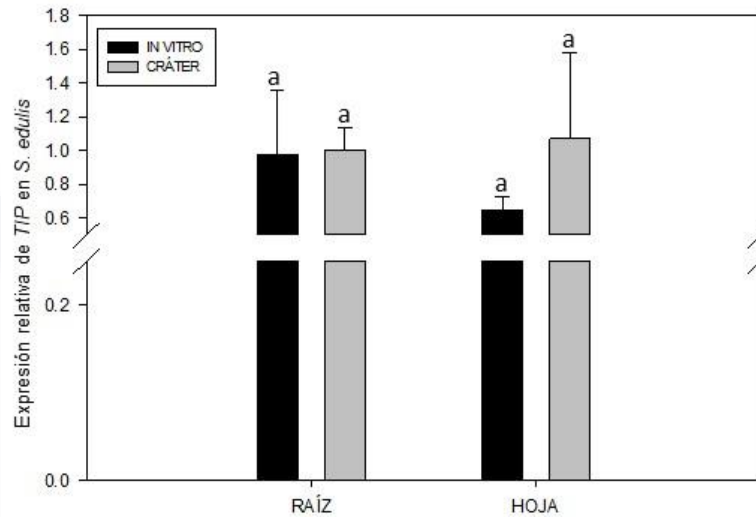


Figura 33. Expresión relativa de *TIP* en *S. edulis*. Se representan los niveles de expresión relativa del gen en la raíz y en las hojas de *S. edulis*; las barras en color negro representan la expresión en plantas del cráter y las barras en gris representan la expresión en plantas *in vitro*. El análisis por qRT-PCR fue normalizado con el gen constitutivo de la β -*Tubulina*. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres réplicas.

El gen *APX*, implicado en mecanismos antioxidativos, no mostró diferencia estadísticamente significativa en su expresión entre las raíces de plantas de cráter y las de cultivos *in vitro*; sin embargo, en las hojas de las plantas del cráter la expresión sí fue estadísticamente más elevada (Figura 34).

El nivel de expresión del gen α -*EXP4*, asociado con cambios expansivos en la membrana celular, fue estadísticamente más elevado tanto en raíces como en hojas de plantas de cráter (Figura 35).

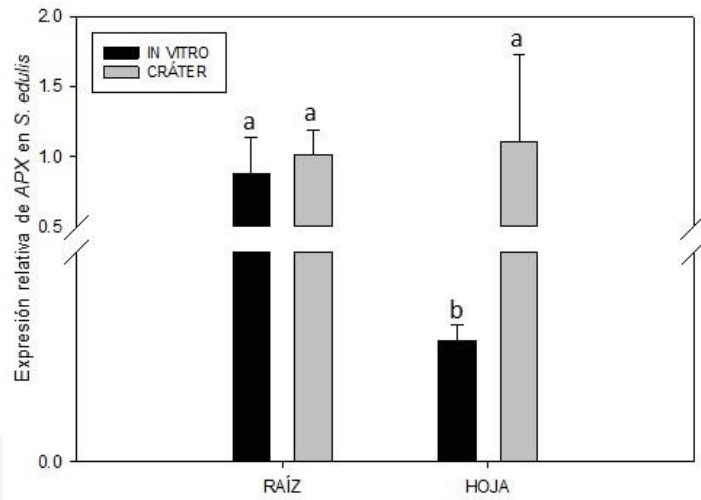


Figura 34. Expresión relativa de APX en *S. edulis*. Se representan los niveles de expresión relativa del gen en la raíz y en las hojas de *S. edulis*; las barras en color negro representan la expresión en plantas del cráter y las barras en gris representan la expresión en plantas *in vitro*. El análisis por qRT-PCR fue normalizado con el gen constitutivo de la β -Tubulina. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres réplicas.

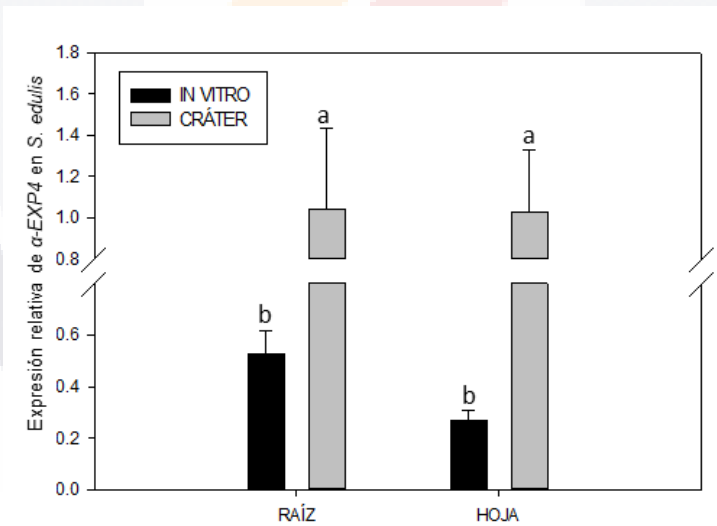


Figura 35. Expresión relativa de α -EXP4 en *S. edulis*. Se representan los niveles de expresión relativa del gen en la raíz y en las hojas de *S. edulis*; las barras en color negro representan la expresión en plantas del cráter y las barras en gris representan la expresión en plantas *in vitro*. El análisis por qRT-PCR fue normalizado con el gen constitutivo de la β -Tubulina. Las barras de error representan las desviaciones estándar de tres réplicas.

7.7 Librería de DNAc de *S. edulis*

La síntesis de ADNc de la parte aérea de la planta y su fraccionamiento se llevó a cabo correctamente mediante el montaje de la columna. Se logró un goteo con intervalos de 35 seg y un tamaño de gota de 30 μ L. La reacción de recombinación y transformación de células competentes se realizó exitosamente con 50 a 100 colonias por cada placa inoculada (Figura 36) y 96 colonias analizadas.

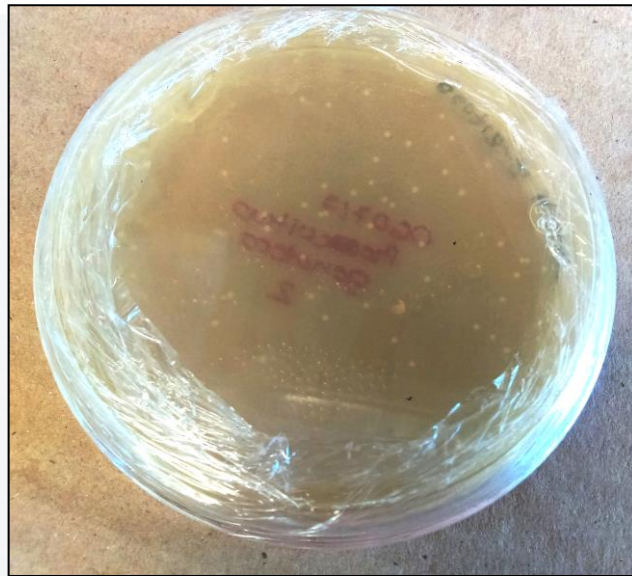


Figura 36. Células competentes One Shot® Top 10 transformadas con el *att*-ADNc de *S. edulis*

Los plásmidos extraídos de cada una de las 96 colonias que conformaron la librería fueron analizados en un gel de agarosa visualizado mediante tinción con bromuro de etidio. En la Figura 37 se muestran algunos de los plásmidos, los cuales se visualizan como dos fragmentos, uno de aproximadamente 2 000 pb y el otro de aproximadamente 5 000 pb, estas bandas podrían representar las formas enrolladas y super enrolladas y/o lineales del plásmido.

De las tres pruebas realizadas para analizar los resultados de la librería se obtuvo lo siguiente: en la primera prueba, fragmentos de aproximadamente 2 000 pb en el ADN plasmídico amplificado con los iniciadores M13 (Figura 38).

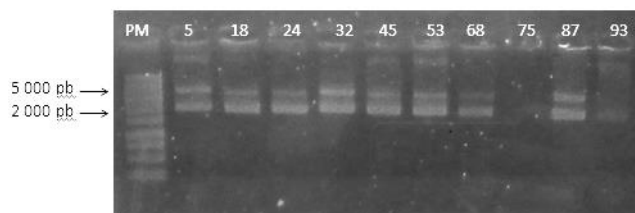


Figura 37. ADN plasmídico de la librería de *S. edulis*. Extracción de plásmidos por lisis alcalina. Electroforesis de agarosa al 0.8 %

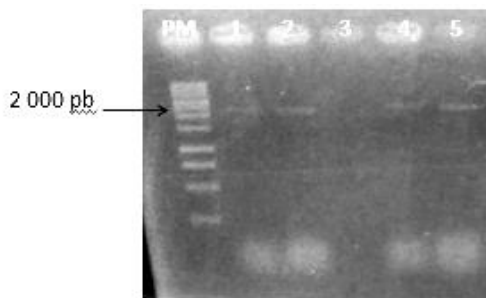


Figura 38. Fragmentos amplificados con M13 en ADN plasmídico de la librería de *S. edulis*. Carriles 1-5: clonas elegidas al azar. Electroforesis de agarosa al 0.8 %

De la segunda prueba, realizada mezclando las 96 colonias de la Genoteca se obtuvieron varios fragmentos correspondientes a los amplicones de M13 y SAMS (Figura 39) y los correspondientes a *CMO*, *BADH*, *P5CS*, *PEAMT* y *VP* (Figura 40). De la tercera prueba, en la que se mezclaron 5 colonias elegidas al azar (26, 27, 28, 29 y 30) se obtuvieron varios fragmentos correspondientes a los amplicones de M13 y SAMS (Figura 42) y los correspondientes a *CMO*, *BADH*, *P5CS*, *PEAMT* y *VP* (Figura 43).

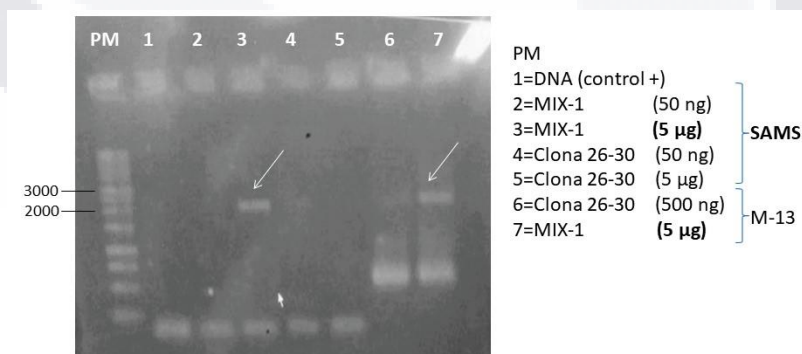


Figura 39. Amplicones de SAMS y M13 en ADN plasmídico de la librería de *S. edulis*. Correspondiente a mezcla de las 96 colonias (Mix-1) y a la mezcla de las clonas 26-30. **1-5)** fragmentos obtenidos con los iniciadores SAMS: 1) ADN control positivo; 2) 50 ng de Mix-1; 3) 5 µg de Mix-1; 4) 50 ng de clonas 26-30; 5) 5 µg clonas 26-30. **6,7)** fragmentos obtenidos con los iniciadores M13: 6) 500 ng de clonas 26-30; 7) 5 µg de Mix-1. Electroforesis de agarosa al 0.8 %

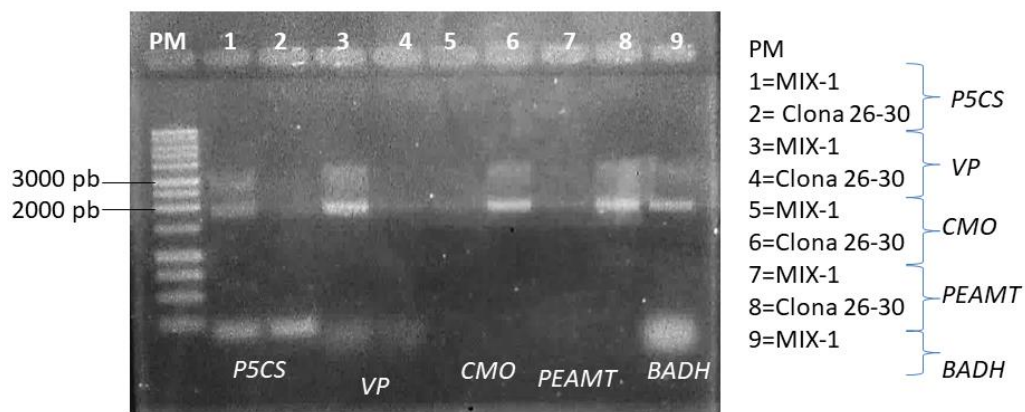


Figura 40. Amplicones de *P5CS*, *VP*, *CMO*, *PEAMT* y *BADH* en ADN plasmídico de la librería de *S. edulis*. Amplicones *P5CS*: 1) Mix-1; 2) clona 26-30; amplicones *VP*: 3) Mix-1 y 4) clona 26-30; amplicones *CMO*: 5) Mix-1 y 6) clona 26-30; amplicones *PEAMT*: 7) Mix-1 y 8) clona 26-30; amplicones *BADH*: 9) Mix-1. Electroforesis de agarosa al 0.8 %

Como se observa en la Figura 39, cuando se realiza la amplificación con SAMS utilizando aproximadamente 5 µg de ADN plasmídico, se observa un fragmento de aproximadamente 2 500 pb que desaparece al utilizar concentraciones entre 500 y 50 ng. El mismo efecto ocurre cuando se amplifica la mezcla de 5 clonas. Esto podría indicar que el fragmento que se observa es el plásmido, pues 5 µg es una concentración elevada que podría inhibir la reacción de PCR.

7.8 Visualización de estomas de *S. edulis*

En este trabajo se proporcionan las primeras micrografías electrónicas de barrido que permiten visualizar a varios aumentos la estructura de estomas de *S. edulis*, tal como se encuentran cuando la planta está en el cráter (Figura 41) y cuando proviene de cultivos *in vitro* (Figura 42). En ambos casos pueden apreciarse estomas abiertos y cerrados, sin embargo en plantas tomadas directamente del cráter se observan depósitos de residuos salinos-arenosos (Figura 41) que no permiten apreciar estas estructuras con tanta claridad como en las plantas provenientes de cultivos *in vitro*, en donde se distingue claramente el poro, las células oclusivas y las células adyacentes de estomas ya sea abiertos o cerrados (Figura 42).

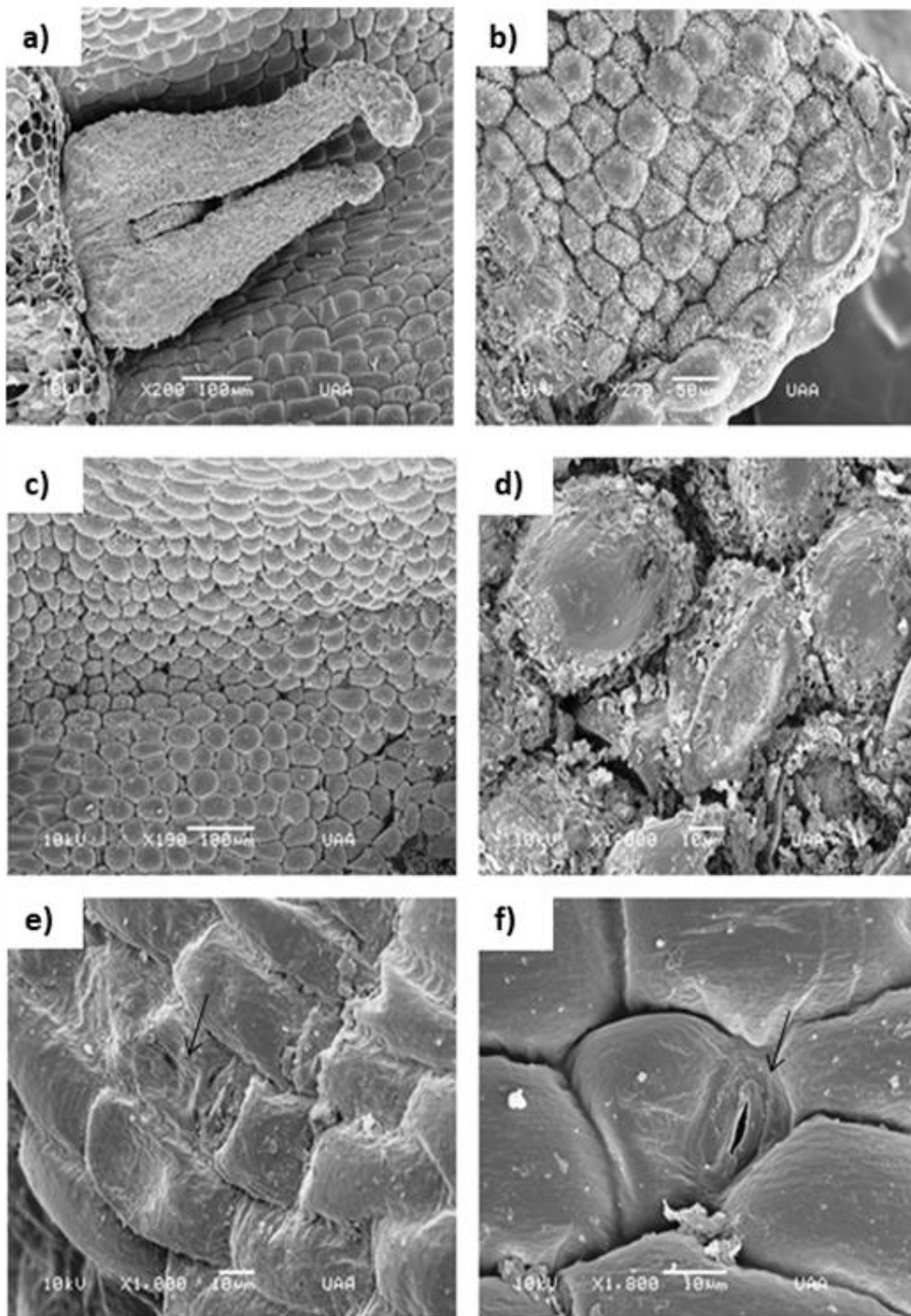


Figura 41. Micrografías electrónicas de barrido de estomas en hojas de *S. edulis* provenientes de cráter. a y c) aumento de 100 μm; b) aumento de 50 μm; d, e y f) aumento de 10 μm. Se señalan con una flecha algunos estomas abiertos y cerrados.

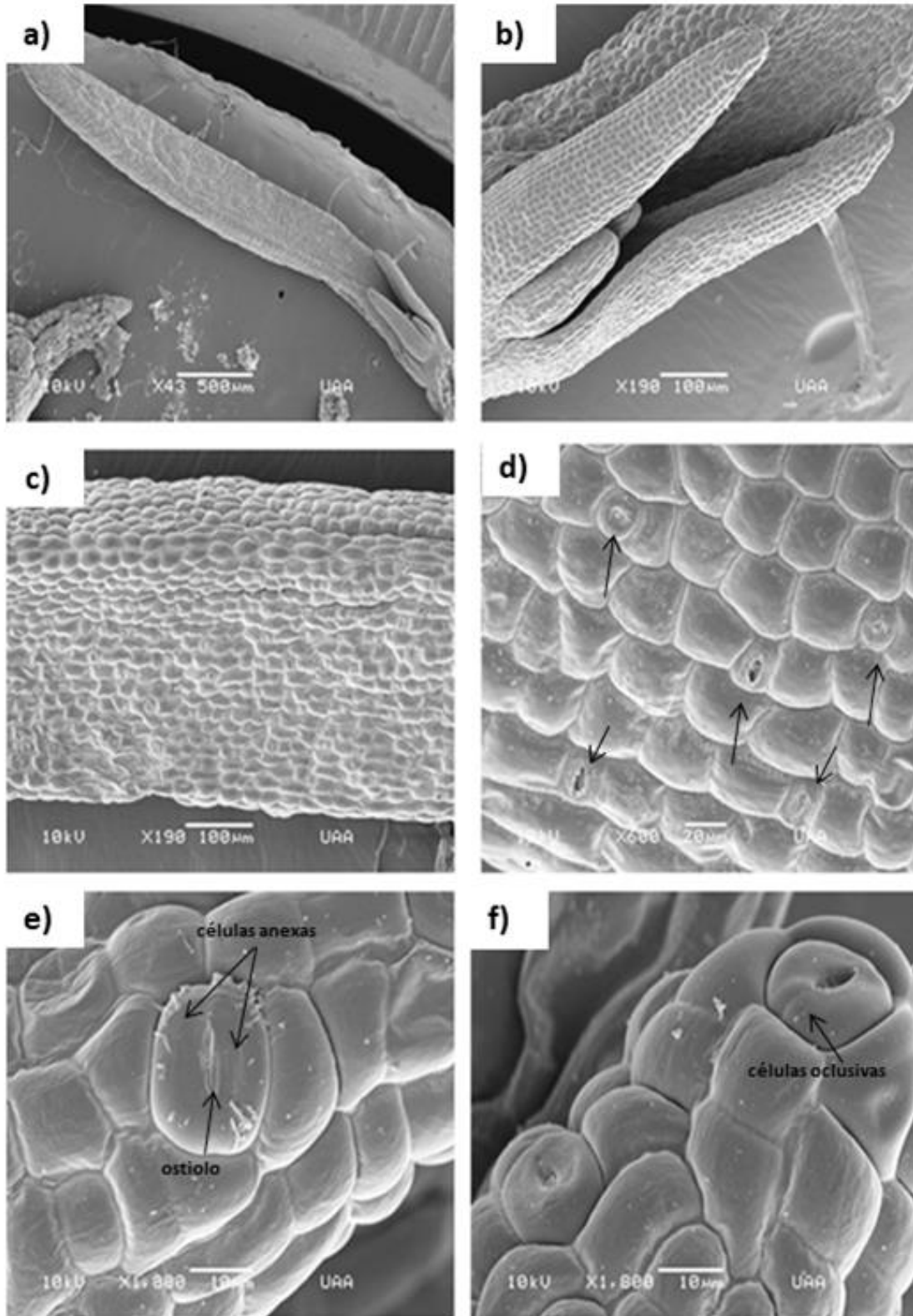


Figura 42. Micrografías electrónicas de barrido de estomas en hojas de *S. edulis* provenientes de cultivos *in vitro*. a) aumento de 500 μm ; **b y c)** aumento de 100 μm ; **d)** Se señalan poros abiertos y cerrados; aumento de 20 μm ; **e y f)** Se señala el ostiolo del estoma y las células oclusivas y anexas; aumento de 10 μm .

8. DISCUSIONES

La verificación taxonómica del modelo de estudio fue posible mediante análisis moleculares (Figuras 4 y 5) y la revisión de las características morfológicas de la planta; en el consenso de los árboles más parsimoniosos generados a partir de la región ITS, nuestra secuencia quedó agrupada en el clado de *S. edulis* y *S. calceoliformis*, tal como lo propone Brand et al. (2015); estos autores resaltaron que la delimitación de especies en el género es difícil dada la escasez de caracteres distintivos, tal como lo menciona también Noguez et al. (2013).

En este trabajo, el resultado de la filogenia muestra que *S. calceoliformis*, *S. occidentalis*, *S. mexicana* y *S. nigra* son las más cercanas a *S. edulis* (Figura 5), incluso se les ha llegado a confundir, ya que sus caracteres morfológicos son casi indistinguibles, especialmente con los de *S. calceoliformis*. En lo reportado por Brandt et al. (2015), se muestran tres linajes monofiléticos y filogenias no resueltas que proponen a la mayoría de las especies americanas como parte de una politomía con pocos nodos internos soportados, atribuyendo esto en parte a la baja divergencia de las secuencias. Sin embargo, con el apoyo de la Dra. Hilda Flores, quien identificó por primera vez a *S. edulis*, se logró confirmar el género y la especie de nuestro modelo de estudio y se determinó que sólo esta especie del género *Suaeda* es la que crece en el suelo salino del cráter.

Los suelos agrícolas afectados por salinidad generan pérdidas mundiales anuales de más de 12 mil millones de dólares. Al mismo tiempo, la creciente cantidad de tierra cultivable que se pierde en la expansión urbana está obligando a la producción agrícola a zonas marginales (Shabala, 2013). En este sentido, los halófitos como componentes importantes en la agricultura salina, pueden ayudar a proporcionar alimento para una población mundial que va en aumento y contribuir a la desalinización de suelos salinos, además de que son fuentes potenciales de genes de resistencia a salinidad (Ke-Fu et al., 1991; Shabala, 2013). Sin embargo, aún con el valor de las plantas halófitas, hay pocos estudios con respecto a su cultivo como tejidos vegetales, por lo que es importante establecer protocolos para la propagación *in vitro* de este tipo de plantas. En este caso, uno de nuestros objetivos fue la micropropagación *in vitro* de *S. edulis*, esto nos permitió disponer de ejemplares de la planta en el laboratorio evitando en lo posible alterar el sitio de muestreo, y de ser posible colaborar en el futuro en su restauración.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Para lograr la propagación *in vitro* de *S. edulis* tuvieron que utilizarse como explantes sólo fragmentos de tejido vegetativo joven, ya que cualquier otra sección de la planta, principalmente tejido reproductivo, excreta mucha más cantidad de compuestos fenólicos, generando así un ennegrecimiento total del medio de cultivo e impidiendo por completo el crecimiento de la planta (Figura 6 y 8). Para prevenir la oxidación de los segmentos que serían utilizados como explantes fue necesario reducir el tiempo de desinfección con etanol, de 3 min a 30 s y también unir los lavados con hipoclorito de sodio y mycrodin® en un solo paso de 10 min; esto permitió obtener cultivos sin contaminación y sin oxidación (Figuras 7 y 10). Un cuidado especial hacia los explantes, fue seccionarlos ligeramente más grandes que su tamaño final para una vez realizada la desinfección, quitar las partes oxidadas si las hubiera, y luego colocarlos en el medio de cultivo.

En la prueba donde se utilizó un pH de 8 con el objetivo de intentar un entorno *in vitro* con algunas características del hábitat natural de la planta (elevado pH), los explantes no sobrevivieron. Sin embargo, a pH de 5.7 el establecimiento de la planta fue exitoso; al respecto, George et al. (2008), mencionan que la mayoría de las plantas *in vitro* pueden tolerar rangos de pH de 4.2 a 7.2 y que por encima de pH 8 mueren. Por otro lado, el agregar carbón activado al medio de cultivo permitió mayor brotación e incluso generación de raíces (Figura 11); ya que uno de los efectos del carbón activado es la adsorción irreversible de compuestos inhibidores en el medio de cultivo y la disminución de la cantidad de metabolitos tóxicos y exudación fenólica, además de liberar sustancias naturales que promueven el crecimiento, alteración y oscurecimiento de los medios de cultivo y absorción de vitaminas, metales, iones y reguladores del crecimiento de las plantas (Thomas, 2008).

Respecto a la propagación en especies del género *Suaeda*, solo se conocen estudios con *S. nudiflora* y con *S. corniculata*. En el primero, se generó tejido de callo a partir de explantes de hojas en medio MS con 2,4-D y kinetina (Cherian & Reddy 2003). En el segundo, la germinación de las semillas se logró *in vitro* y las plántulas obtenidas se transfirieron a la tierra para asegurar el material vegetal y caracterizar el gen *BADH* (Wang et al., 2016). Sin embargo, en la propagación de otras halófitas, se han utilizado la combinación de citocininas y auxinas, como en el caso de *Atriplex halimus*, donde se usó un tratamiento para la brotación y otro para la generación de raíces (Aldahhak et al., 2010). En *Salicornia brachiata* se utilizaron brotes y nodos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

como explantes en medio MS con combinaciones de auxinas y citocininas más NaCl 250 Mm, donde se obtuvo un gran número de brotes, y se observó que NaCl ayudó al enraizamiento (Joshi et al., 2012). En estudios de regeneración indirecta *in vitro* de *Bienertia sinuspersici*, el vástago se usó como explante en MS añadida con 2,4-digoxina (2,4-D) y con BA para brotes (Rosnow et al., 2011).

Hasta el momento, no hay informes en la literatura sobre la propagación *in vitro* de *S. edulis*. Por lo tanto, la metodología estandarizada en este trabajo representa un protocolo simple y rápido para la micropropagación de la especie, demostrando que no es necesario combinar otros reguladores de crecimiento para inducir un gran número de brotes, ni usar otros medios para enraizar.

Este protocolo ayudará a la conservación de este halófito en caso de que sea necesario reubicarlo en su hábitat natural. Por el momento, las plantas micropropagadas fueron utilizadas primero, para comparar el nivel de expresión de los genes en plantas *in vitro* y en plantas en campo, pero a largo plazo podrían ser utilizadas también para su uso en la remediación de suelos afectados como se ha realizado ya con especies como *S. salsa*, ya que se demostró que su plantación *in situ* aumentó la materia orgánica y el nitrógeno total del suelo en un 43% y un 18% respectivamente con respecto al suelo que no se plantó (Lin et al., 2005). Se ha demostrado además que *S. salsa* puede eliminar sales y metales pesados de los suelos salinos (Song & Wang, 2015) y que *S. esteroa* y *S. bigelovii* pueden usarse como biofiltros de aguas residuales en acuicultura salina mejorando los resultados obtenidos con nitrógeno (Brown et al., 1999).

El análisis del contenido de minerales en los diferentes órganos de *Suaeda edulis* reveló que existen ligeras diferencias entre las cantidades de iones detectadas en la raíz, con respecto a las detectadas en la parte aérea de la planta. Sin embargo, la cantidad de sodio detectada en la parte aérea fue casi cuatro veces mayor que la que se detectó en la raíz (Tabla 3), lo que manifiesta en parte, la resistencia de la planta a la salinidad más que a sequía, pues vemos que la planta sí está tomando los compuestos del suelo a través del agua y los está transportando hacia su parte aérea. Esto es interesante por el hecho de que el lugar de muestreo de la planta es un lago-cráter que ha sido ya catalogado como un lago sódico por su composición iónica, predominando en él los carbonatos y bicarbonatos de sodio (CONABIO 2008) tal como lo reflejan los resultados del análisis de suelo en este trabajo, en los que se indican

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

valores de pH y conductividad eléctrica elevados que lo clasifican como suelo salino y altamente alcalino (Tabla 2). En este tipo de suelos el porcentaje de sodio intercambiable es mayor a 15 y su estructura, permeabilidad y aireación se ven afectadas limitando e impidiendo el crecimiento de los cultivos por su alto contenido de sodio intercambiable y sales solubles (NOM-0121-SEMARNAT-2000).

La superficie del suelo del cráter presenta una alta proporción de arcilla (más de 30 %) al menos hasta 50 cm de profundidad, y desarrolla fisuras de hasta un cm de ancho; sin embargo, existe vegetación que crece en este sitio aún bajo las condiciones mencionadas, predominantemente *Distichlis spicata* (CONABIO, 2008) y *S. edulis* (Noguez et al., 2013), los cuales deben desarrollar mecanismos que les permitan llevar a cabo su ciclo de vida bajo las condiciones descritas (Figura 3). Entendemos que la tolerancia a este tipo de suelos está mediada por diversas reacciones bioquímicas y procesos fisiológicos controlados por mecanismos moleculares de naturaleza multigénica que en este trabajo tuvimos como objetivo analizar.

Para poder llevar a cabo la amplificación de los genes de interés en *S. edulis* fue necesario estandarizar protocolos de extracción de ácidos nucleicos, y los métodos que se utilizaron en este trabajo pusieron de manifiesto la gran cantidad de compuestos fenólicos que la planta genera (Figura 12), y la necesidad de eliminarlos para lograr obtener ácidos nucleicos viables, de buena calidad, estables y puros.

El protocolo que permitió los resultados deseados fue el reportado por Gurudeeban et al. (2001). Lo notable de este protocolo fue el uso adecuado de isopropanol y etanol al 100 % para precipitar el ADN y de PVPP y etanol al 70 % para quitar compuestos fenólicos, permitió obtener muestras sin la turbidez generada por los compuestos fenólicos y un ADN de buena calidad analizado por electroforesis en agarosa (Figura 12d) disponible para análisis molecular.

En el caso del aislamiento del ARN se logró obtener este material con los dos protocolos de extracción realizados con concentraciones entre 50 y 120 ng/μL que permitieron la síntesis de ADN complementario para realizar los análisis de expresión de genes implicados en los mecanismos de tolerancia a estrés salino, entre los cuales se encuentra la producción de GB.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

En experimentos sobre salinidad y acumulación de GB se observó en *S. maritima* y *S. fruticosa*, que cuando las plantas crecen con altas concentraciones de NaCl, ocurre la acumulación de GB, y se ha especulado que la GB actúa como un agente citoplásmico no tóxico osmoregulador que mantiene el equilibrio osmótico intracelular (Flowers & Hall, 1978; Hall et al., 1978; Khan et al., 2000a). Así mismo, en otros trabajos se observó la acumulación citoplásmica de GB de casi 10 veces más en *S. aralocaspica*, *S. eltonica* y *S. heterophylla* en respuesta a salinidad; los autores sugieren que la GB podría contribuir significativamente al potencial osmótico citoplasmático (Park et al., 2009).

En general, los estudios génicos sobre la biosíntesis de GB comienzan con CMO. Sin embargo, en este trabajo decidimos estudiar a partir de la SAMS (Figura 1), ya que esta enzima juega un papel muy importante en el estrés abiótico y cataliza la formación de S-adenosil metionina (SAM) que es una molécula crítica para diferentes procesos metabólicos tales como: la metilación del ADN, y en la síntesis de etileno, poliamidas, proteínas y lípidos (Lim et al., 2002; Pulla et al., 2009). Varios genes y proteínas de SAMS se han clonado y secuenciado en varias especies y se ha observado que la secuencia de aminoácidos tiene tres motivos conservados. El primero es la unión a la metionina GHPDK y se encuentra en el extremo amino. El segundo es GAGDQG, que es un enlace ATP y está ubicado centralmente. El tercero es GGGAFSGK, que forma un bucle P para la región de unión a fosfato (Van Breusegem et al., 1994; Yoon et al., 2006, Li et al., 2013, Wang et al., 2016).

En este trabajo, la secuencia parcial de aminoácidos deducida de SeSAMS presentó el motivo conservado GAGDQG para la unión de ATP y mostró 97% de similitud con la SAMS de *S. salsa*, lo que se manifiesta en la relación filogenética estrecha entre las secuencias de estas proteínas (Figura 15 y 16). El empalme del modelo hipotético de la estructura terciaria SeSAMS coincide con la cadena B de la 4kt transferasa, demostrando así que SeSAMS posee en su secuencia las regiones conservadas propias de las enzimas de su tipo (Figura 16).

En plantas superiores, la GB se sintetiza en dos etapas oxidativas enzimáticas de la colina, catalizadas por CMO y BADH, respectivamente que se llevan a cabo en el cloroplasto (Yu et al., 2014). Para analizar los dominios y motivos conservados en CMO, se han realizado alineamientos múltiples de secuencias proteicas de CMO, y parecidas a CMO y todas presentan dos motivos conservados: 1) para la coordinación

del grupo de Rieske [2Fe-2S] tipo CXHX15-17 CXH EI, y 2) para la coordinación de no hemo Fe mononuclear, G / DXDX2HX4-52 H (Hibino et al., 2002). La secuencia putativa en aminoácidos de SeCMO mostró el motivo conservado para la coordinación de Fe no hemo mononuclear y una relación evolutiva muy estrecha con *S. liaotungensis* y *S. maritima* (Figuras 19 y 20).

En cuanto al fragmento putativo en aminoácidos de SeBADH, su secuencia fue muy corta y, aunque no incluye el decapeptido característico VTLELGGKSP de estas enzimas, tiene el dominio ALDH altamente conservado (Figuras 21 y 22) que la sitúa dentro de la súper familia de las deshidrogenasas, enzimas dependientes de NAD(P)⁺. Esta súper familia en general oxida una amplia gama de aldehídos alifáticos endógenos y exógenos, y a sus ácidos carboxílicos correspondientes; además, algunos miembros esta familia desempeñan un papel importante en la desintoxicación y poseen múltiples funciones catalíticas y no catalíticas debido a que actúan también como proteínas de unión y como osmoreguladores (Li et al., 2006; Yu et al., 2011).

Estas proteínas presentan tres dominios: un dominio de unión a cofactor, un dominio catalítico y un dominio tipo puente Y la enzima activa es generalmente homodimérica o homotetramérica (Wongpanya et al., 2011). Se ha planteado que el mecanismo catalítico involucra un cofactor de unión, lo que resulta en un cambio conformacional y la activación de un nucleófilo cisteína. Las proteínas ALDH están representadas por las enzimas que comparten un número de residuos altamente conservados necesarios para la catálisis y cofactor de unión; se incluyen en este grupo las ALDH de humanos, plantas, hongos y protozoos. Todas estas proteínas tienen una cisteína conservada que se alinea con la cisteína catalítica del grupo ALDH (Jiamsomboon et al., 2012). La historia evolutiva de SeBADH lo agrupó en un clado que incluye la BADH de *S. liaotungensis* (Figura 24b).

En plantas de *S. europaea* se ha observado que el contenido de GB en las hojas es mayor que en *S. maritima* sin embargo, *S. maritima* acumula niveles más altos de Pro (Moghaieb et al., 2004) lo que sugiere que algunas especies que se comportan como acumuladores de GB contienen poca Pro y viceversa, y que la participación de los solutos compatibles en el ajuste osmótico podría variar entre los halófitos (Song et al., 2006; Tipirdamaz et al. 2006).

Se ha demostrado que una de las enzimas participantes en la biosíntesis de Pro, la P5CS, se activa en *S. physophora* y *Medicago sativa* cuando las plantas están bajo diferentes tipos de estrés ambiental (Ginzberg et al., 1998; Song et al., 2006). En *S. edulis*, la P5CS solo presentó una parte del dominio de glutamato 5-quinasa (γ -GK) correspondiente a proB (PLN02418), representativo de las P5CSs (Figura 26), las cuales contienen enseguida una región gamma-glutamil fosfato reductasa (γ -PR) correspondiente a proA (Pérez-Arellano et al., 2010; Miyoshi et al., 2011); el γ -GK presente en SeP5CS produce P5C a partir de glutamato, y al parecer juega un papel primordial en la osmotolerancia, pues se ha demostrado que está asociado con la acumulación de prolina y que cuando esta región es introducida en *Arabidopsis* la planta mejora su tolerancia osmótica (Chen et al., 2006; Chen et al., 2007).

En cuanto a los genes relacionados con la compartimentalización del Na^+ , en este trabajo se identificó el fragmento parcial de un gen que codifica la pirofosfatasa vacuolar inorgánica (H^+ V-PPasa). Su secuencia en aminoácidos presentó regiones altamente conservadas con otras proteínas similares, como el motivo catalítico [DE] X7KXE, que es común tanto para la H^+ -PPasa soluble como para la de membrana, y funciona como enlace o hidrólisis del sustrato en la superficie de la membrana desde el lado del citoplasma (Nakanishi & Maeshima, 1998; Drozdowicz & Rea; 2001). De esta manera, algunas plantas, particularmente halófitas, evaden los efectos tóxicos de la sal mediante el secuestro de Na^+ en sus vacuolas con la bomba de Na^+/H^+ para mantener bajo el nivel de sodio en el citoplasma (Guo et al., 2006).

Para identificar los polipéptidos V-PPasa, se han generado anticuerpos policlonales universales como PABTK que contiene la región TKAADVGADLVGKIE y la región HKA AVIGDTIGDPLK (Kim et al., 1994; Drozdowicz & Rea; 2001); SeVP contiene la región PABTK (Figuras 25 y 26) lo que indica que la proteína se puede identificar mediante estos anticuerpos. Otra forma de identificar estas enzimas tipo V-PPasa es mediante amplificación por PCR con iniciadores dirigidos a las regiones nucleotídicas que codifican uno o más de sus motivos característicos, y luego mediante análisis bioinformáticos de la secuencia amplificada se obtiene su traducción putativa generar filogenias con otras proteínas homólogas. De esta manera fue como se logró identificar y hacer filogenia entre las proteínas reportadas en las bases de datos y la VP de *S. edulis*. En la Figura 25 se observa que SeVP se subagrupa con VP de *S. corniculata*, *H. caspica* y *K. foliatum*.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Respecto a SeDREB, es un gen que codifica una proteína que actúa como factor de transcripción, uniéndose a elementos específicos presentes en el promotor de un gen blanco. La estructura proteica de un factor de transcripción típico consiste de dos dominios: el dominio de unión al ADN, responsable de unirse a elementos específicos que actúan en cis en las regiones del promotor, y el dominio regulatorio responsable de la regulación transcripcional de los genes blanco, el cual se une a la maquinaria de transcripción (Shen et al., 2009). De esta manera, los factores de transcripción modulan la actividad de la ARN polimerasa II. regulando así la tasa de transcripción de sus genes blanco a través de un sistema denominado regulón (Nakashima et al., 2009; Saibo et al., 2009). Los principales regulones son el DREB/CBF, el NAC/ZFHD; el AREB/ABF; y el MYC/MYB; se ha observado que particularmente DREB/CBF activa la expresión de genes que aumentan la tolerancia al estrés abiótico (Saibo et al., 2009).

La secuencia DREB2 en *S. edulis* mostró la presencia del dominio AP2 de unión al DNA (Figura 27); todos los factores de transcripción tienen un dominio de unión al ADN, en el caso de DREB/CBF este dominio conservado es llamado AP2/ERF y consiste de aproximadamente 60 aminoácidos formados en 3 láminas β conectadas de forma antiparalela con bucles y hélices α (Lata & Prasad 2011). Los aminoácidos, ácido glutámico (en la posición 19) y Valina (en posición 14) están bastante conservados en el dominio AP2/ERF y desempeñan un papel vital en la especificidad de unión DRE (Sakuma et al., 2002). En la Figura 27c se muestra el empalme de los Dominios AP2 en SeDREB2 y en 1GCC de *A. thaliana*; de acuerdo con su historia evolutiva, SeDREB2 se subagrupa con DREB de *S. brachiata* (Figura 27b).

Además de los análisis bioinformáticos de los genes, en este trabajo se analizaron sus niveles de expresión en *S. edulis* cultivadas *in vitro* y se compararon con los detectados en *S. edulis* proveniente del cráter salino, ya que para sobrevivir en estos suelos es importante que la planta logre percibir señales externas y expresar respuestas adaptativas a nivel morfológico, fisiológico, bioquímico y molecular. Esta transmisión de señales que activan una respuesta adaptativa, son componentes críticos para la supervivencia y la regulación transcripcional de los procesos moleculares juega un papel preponderante.

En lo referente a los análisis de expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de GB, la expresión de todos los genes analizados fue mayor en las hojas de las plantas del cráter con respecto a las de plantas *in vitro* (Figura 30). Existen

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

estudios con especies de *Suaeda*, por ejemplo en *S. europea*, en donde el aumento en la expresión de estos genes muestra correlación directa con el aumento en la concentración de NaCl (Lv et al., 2012). Resultados similares se observaron para *BADH* y *SAMS* de *S. salsa* (Sahu y Shawn 2009), *Suaeda aegyptiaca* (Askari et al., 2006) y *Atriplex nummularia* (Tabuchi et al. 2005) demostrando que los niveles de transcripción y las proteínas de *SAMS*, *PEAMT*, *CMO* y *BADH*, fueron mas elevados en las hojas que en la raíz de las plantas bajo estrés salino, y que además se acumuló GB, lo que sugiere que la GB podría estar sintetizando principalmente en la parte aérea de la planta, y que los niveles de *SAMS* son co-regulados con los de *BADH*, *PEAMT* y *CMO* para abastecer de S-adenosilmetionina (*SAM*) sintetizada por *SAMS* y utilizada por *PEAMT* como un donador de grupos metilo para la síntesis de GB. La elevada expresión de *BADH* ha sido asociada con un aumento en su actividad enzimática en respuesta a la salinidad, y se argumenta que la *BADH* se transporta a la raíz después de sintetizarse en hojas (McCue & Hanson 1992; Wang et al., 2013). Con la actividad de la enzima *BADH*, la célula vegetal mantiene la integridad de las membranas, la actividad fotosintética permanece activa y se reduce la producción de especies reactivas de oxígeno (Fan et al., 2012).

En 2001, Zhang et al. estimularon plantas de *S. salsa* con NaCl 400 mM y demostraron la sobreexpresión de *CMO*; luego en 2018, Kuttan et al. demostraron en plantas de *S. maritima* tratadas con NaCl 200 mM la sobreexpresión de *SAMS*; sin embargo, observaron que la expresión de *BADH* es mucho más baja que la expresión de *CMO*, demostrando que la sobreexpresión de *CMO* en condiciones salinas es esencial para que ocurra una elevada acumulación de GB en el tejido. También en *S. aralocaspica* bajo estrés salino se demostró la acumulación de GB y de las proteínas *CMO* y *BADH* que participan en su síntesis (Park et al., 2009), y se han realizado trabajos en los que se utilizan las secuencias de estos genes para introducirlos en plantas no halófitas y mejorar su tolerancia a salinidad. Por ejemplo, *BADH* de *S. oleracea* fue introducido y expresado en *Ipomoea batatas* permitiéndole aumentar su tolerancia a la salinidad, al estrés oxidativo y a bajas temperaturas (Fan et al., 2012). También *BADH* de *S. liaotungensis* integrado al genoma de *Nicotiana tabacum* le permitió a esta planta tolerar hasta 200 mM de NaCl; a estas concentraciones las plantas no transformadas se tornan amarillas y mueren (Li et al., 2003). McCue & Hanson en 1992, reportaron un aumento de 5 veces más en la expresión de *BAHD* en raíz y hoja de *Beta vulgaris* expuestas a 500 mM de NaCl. Los mismos autores reportaron dos alelos de aproximadamente 1.7 kb codificando un polipéptido de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

alrededor de 500 aminoácidos con 83 % de similitud con secuencias de *Spinacia*. En este trabajo la secuencia *BADH* de *S. edulis* presentó similitud con la de *Spinacia*, probablemente el porcentaje de similitud sería mayor si se contara una secuencia más larga o completa de *BADH* en *S. edulis*.

Respecto a *P5CS*, sus niveles de expresión fueron significativamente más altos en las raíces y hojas de *S. edulis* provenientes del cráter (Figura 30). También en las raíces de plántulas de *O. sativa* se observó que los niveles de expresión de *P5CS* aumentaron en respuesta al tratamiento con NaCl 250 mM (Hur et al., 2004). En *S. salsa*, después de la exposición con NaCl 425 mM, se detectó una sobreexpresión de *P5CS* (Sahu & Shaw 2009). El aumento de la expresión de este gen se ha asociado con el aumento de la producción de Pro y la tolerancia a la salinidad (Hymida-Sayari et al., 2005), y se ha sugerido que la síntesis de Pro en la raíz parece ser un parámetro importante para diferenciar los halófitos desde su síntesis en las plantas tolerantes comienzan junto con el estrés iónico y alcanzan niveles más altos que en las plantas susceptibles (Jacobs et al., 2003).

También la expresión de *VP* mostró mayor expresión en hojas de *S. edulis* provenientes del cráter con respecto a las cultivadas *in vitro* (Figura 31), probablemente debido a que en el cráter la planta están en contacto con concentraciones muy altas de sales y sodio, y se ha demostrado que este tipo de H⁺V-PPasas aumenta la tolerancia a la salinidad en varias especies de plantas, manteniendo el sodio dentro de las vacuolas, y que especies como *S. salsa*, utilizan estas enzimas como la estrategia principal de tolerancia a suelos sódico-salinos (Wang et al., 2001; Gaxiola et al., 2012). En estudios con *S. corniculata*, otro halófito nativo del suelo salino-alkalino, se demostró que las transcripciones de estos genes aumentan más en respuesta a los carbonatos que al NaCl (Li et al., 2018).

La expresión de los genes *DREB1* ha sido investigada extensivamente en varios cultivos y con diferentes tipos de estrés abiótico, y se ha demostrado que es inducida por frío, pero no por deshidratación o salinidad (Liu et al., 1998; Shinwari et al., 1998); por otro lado, la expresión de *DREB2* ha sido analizada en un limitado número de especies de plantas, y se ha encontrado que es inducida por estrés salino y por deshidratación, pero no por frío (Nakashima et al., 2000; Dubouzet et al., 2003; Shen et al., 2003). En este trabajo se encontraron mayores niveles de expresión en hojas y raíces de *S. edulis* proveniente del cráter, con respecto a las plantas cultivadas *in vitro*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

(Figura 32). Al respecto, se demostró que la sobreexpresión de *DREB* en *S. salsa*, fue inducida significativamente por salinidad y sequía, y el gen fue utilizado para generar plantas de tabaco transgénicas, las cuales presentaron un mejor crecimiento, mayor contenido de clorofila, una tasa neta de fotosíntesis, y un mayor nivel de prolina y azúcares solubles, asociados a la sobreexpresión de *SsDREB*, demostrando así tolerancia de la planta transgénica al estrés salino (Zhang et al., 2015).

En este estudio se investigó la subfamilia TIP de las AQP's en *S. edulis* y encontramos que el gen *TIP* no muestra diferencias en sus niveles de expresión entre hojas y raíces de plantas de cráter con respecto a las plantas cultivadas *in vitro* (Figura 33); a diferencia de lo que ocurre en otras plantas, por ejemplo en eucalipto, donde se encontraron elevados niveles de expresión de *TIP* en diferentes órganos y tejidos como una respuesta a varios tipos de estrés (Rodríguez et al., 2016); no obstante, en plantas de *Arabidopsis* transformadas con el gen *TIP* de *G. soja* se observó una gran pérdida de agua en la planta y decremento en su tolerancia a salinidad asociado a la sobreexpresión de *GsTIP*, sin embargo, no se afectó su crecimiento frente a estrés por frío, ni en condiciones favorables (Wang et al., 2010). Mediante el uso de anticuerpos específicos, se ha demostrado que diferentes isoformas de *TIP* pueden tener diferentes funciones fisiológicas; por ejemplo, en *Mesembryanthemum crystallinum* la abundancia de TIP1 y 2 disminuyó cuando la planta estuvo expuesta al estrés salino; los autores sugieren que los *TIP* pueden desempeñar algún papel en las respuestas al estrés (Kirch et al., 2000).

Otra forma de respuesta adaptativa a la salinidad, es la eficiencia que los halófitos muestran con respecto al uso del agua (Glenn et al., 1999), en este proceso las AQP's permiten a la planta transportar agua dentro y fuera de las células mediante gradientes de potencial hídrico. Las AQP's de plantas se clasifican en cinco subfamilias principales, incluidas las proteínas intrínsecas de membrana plasmática (PIP), proteínas intrínsecas de tonoplasto (TIP), nodulina 26 tipo proteínas intrínsecas (NIP), pequeñas proteínas intrínsecas básicas (SIP) y proteínas intrínsecas X o no caracterizadas (XIP) (Hussain et al., 2011; revisado en Ranganathan et al., 2018). Las AQP se localizan en las membranas celulares de todas las células vivas; en plantas están localizadas en el tonoplasto y la membrana plasmática. La regulación de la actividad de las AQP's y la expresión de sus genes, también se consideran parte de los mecanismos de adaptación a las condiciones de estrés y se basan en procesos complejos y vías de señalización, así como en factores complejos de transcripción,

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

traducción y postranscripción. La activación de AQP a través de diferentes mecanismos puede desempeñar un papel clave en las respuestas de las plantas al estrés ambiental al mantener la absorción y el movimiento del agua en el cuerpo de la planta (revisado en Ranganathan et al., 2018).

Durante el estrés salino, las modificaciones en la pared celular también son una respuesta de defensa común en las plantas. Hangxia et al., (2016) generaron el transcriptoma de *S. glauca* en respuesta a salinidad y encontraron que la mayoría de los genes identificados estaban relacionados con la pared celular y el crecimiento; por ejemplo, la expansina-A4 (c20751.graph_c0) y la expansina-A2 (c36645.graph_c0), que están involucradas en la elongación de la célula y las modificaciones a la pared celular (An et al., 2007) se encontraron sobre reguladas bajo estrés salino. En este mismo estudio se encontraron sobre regulados genes que participan en el metabolismo antioxidante, dado que la salinidad induce también la producción de ROS (especies reactivas de oxígeno). Entre los genes antioxidantes de *S. glauca* sobre regulados en respuesta a NaCl 300 mM, está el unigen c44071.graph_c0 que es un homólogo de una APX de *B. vulgaris*; y la c26327.graph_c0 que es un homólogo de una peroxidasa también de *B. vulgaris*. Los autores sugieren que APX podría estar involucrado en la eliminación de ROS bajo estrés salino en *S. glauca*. En este trabajo investigamos ambos genes, APX y α -EXP4 para conocer su comportamiento en *S. edulis* respecto al suelo salino donde crece. La respuesta génica que encontramos demostró que efectivamente, α -EXP4 eleva sus niveles de expresión tanto en hojas como en raíces de plantas del cráter (Figura 35); sin embargo, APX sólo mostró niveles estadísticamente más elevados en las hojas de las plantas de cráter, pero no en las raíces (Figura 34), tal como se observó en plantas de *Lens culinaris* estimuladas con NaCl 200 mM, donde la sobreexpresión de APX fue mayor en las hojas que en las raíces en respuesta al daño causado por el estrés salino (Bandeoğlu et al., 2004).

En ambientes salinos las plantas inducen el cierre de estomas para limitar la pérdida de agua por transpiración, y así conservarla por más tiempo en sus células, sin embargo, esta medida de protección puede llegar a ser perjudicial para su supervivencia, ya que el cierre de los estomas provoca también una reducción en la asimilación del CO₂ por parte del cloroplasto, convirtiéndolo también en un recurso limitado (Garzón & García, 2011). En este trabajo se reportan las primeras micrografías electrónicas de los estomas en las hojas de *S. edulis* con el objetivo de visulaizar cómo es que se encuentran dichas estructuras en las plantas que se que

desarrollan su ciclo de vida completo en suelo salino de manera habitual, y en las plantas cultivadas *in vitro*. En ambos casos se logró apreciar estomas abiertos y cerrados. En las micrografías de las plantas del cráter se visualizan pequeños depósitos de residuos salinos-arenosos (Figura 41); sin embargo, en las hojas de plantas cultivadas *in vitro*, se distingue claramente el poro, las células oclusivas y las células adyacentes (Figura 42); no obstante, sería interesante obtener más material de este tipo para ir más allá de la visualización de estas estructuras y entonces medir las conductancias estomatales después de la exposición a NaCl, ya que esto ha sido considerado como un buen método para la detección de la tolerancia al estrés osmótico (James et al., 2008), y a diferencia de las mediciones de la fotosíntesis o de la tasa de expansión de la hoja, la medición de la conductancia estomática es más rápida, y es finalmente es un indicador confiable tanto de disminuciones en la fotosíntesis como de la tasa de crecimiento. De tal forma, que conocer estos datos podría ser un medio para medir la tolerancia al estrés en cada planta, en este caso en *S. edulis*.

9. CONCLUSIONES

- Se implementó un protocolo para la propagación masiva *in vitro* de *S. edulis*.
- Se caracterizaron siete secuencias parciales de genes de respuesta a estrés salino. El análisis de la secuencia putativa en aminoácidos de estos genes permitió determinar las relaciones filogenéticas y predecir las estructuras tridimensionales y su acoplamiento con otras proteínas de su tipo, evidenciando que SeSAMS, SePEAMT, SeCMO, SeBADH, SeP5CS, SeVP y SeDREB2 comparten el 90-95% de identidad con las de otras plantas en bases de datos públicas.
- El análisis de la expresión de los genes en hojas y raíces de las plantas provenientes de cráter y de cultivos *in vitro*, reveló que *BADH*, *CMO*, *P5CS*, *VP*, *DREB2* y *α -EXP4* fue mayor en hojas y raíces de plantas del cráter; sin embargo, la expresión de *SAMS* y de *APX* sólo fue estadísticamente mayor en las hojas de las plantas del cráter, pero no en las raíces, mientras que *TIP* no mostró diferencias estadísticamente significativas en sus niveles de expresión en ambos órganos.
- Se construyó una librería de la parte aérea de *S. edulis* a partir de la cual podrían identificarse fragmentos más largos de los genes analizados en este trabajo y otros genes asociados con el proceso de tolerancia a salinidad.
- Se proporcionan las primeras micrografías electrónicas de los estomas de *S. edulis* cuando se encuentra en su hábitat sódico-salino y cuando proviene de cultivos *in vitro*.

10. BIBLIOGRAFIA

- Abdallah, S. B., Aung, B., Amyot, L., Lalin, I., Lachâal, M., Karray-Bouraoui, N., & Hannoufa, A. (2016). Salt stress (NaCl) affects plant growth and branch pathways of carotenoid and flavonoid biosyntheses in *Solanum nigrum*. *Acta physiologiae plantarum*, 38(3), 72.
- Ache, P., Bauer, H., Kollist, H., Al-Rasheid, K. A., Lautner, S., Hartung, W., & Hedrich, R. (2010). Stomatal action directly feeds back on leaf turgor: new insights into the regulation of the plant water status from non-invasive pressure probe measurements. *The Plant Journal*, 62(6), 1072-1082.
- Agarwal P. K, B Jha (2010) Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signalling. *Biologia Plantarum* 54, 201-212.
- Agarwal, P. K., Shukla, P. S., Gupta, K., & Jha, B. (2013). Bioengineering for salinity tolerance in plants: state of the art. *Molecular biotechnology*, 54(1), 102-123.
- Aldahhak, O., Zaid, S., da Silva, J. A. T., & Abdul-Kader, A. M. (2010). In vitro approach to the multiplication of a halophyte species forage shrub *Atriplex halimus* L. and in vitro selection for salt tolerance. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 4(1), 8-14.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410.
- An C, Saha S, Jenkins J, Scheffler B, Wilkins T, Stelly D. Transcriptome profiling, sequence characterization, and SNP-based chromosomal assignment of the EXPANSIN genes in cotton. *Molecular Genetics and Genomics*. 2007; 278(5), 539–553.
- Araújo, W. L., Fernie, A. R., & Nunes-Nesi, A. (2011). Control of stomatal aperture: a renaissance of the old guard. *Plant signaling & behavior*, 6(9), 1305-1311.
- Ashihara, H., Adachi, K., Otawa, M., Yasumoto, E., Fukushima, Y., Kato, M., ... & Baba, S. (1997). Compatible solutes and inorganic ions in the mangrove plant *Avicennia marina* and their effects on the activities of enzymes. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 52(7-8), 433-440.
- Askari, H., Edqvist, J., Hajheidari, M., Kafi, M., & Salekdeh, G. H. (2006). Effects of salinity levels on proteome of *Suaeda aegyptiaca* leaves. *Proteomics*, 6(8), 2542-2554.
- Bandoğlu, E., Eyidoğan, F., Yücel, M., & Öktem, H. A. (2004). Antioxidant responses of shoots and roots of lentil to NaCl-salinity stress. *Plant Growth Regulation*, 42(1), 69-77.

- Binzel, M., & Ratajczak, R. (2002). Function of membrane transport systems under salinity: tonoplast. In *Salinity: Environment-Plants-Molecules* (pp. 423-449). Springer, Dordrecht.
- Bohnert, H. J., & Jensen, R. G. (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in biotechnology*, 14(3), 89-97.
- Bose, J., Rodrigo-Moreno, A., & Shabala, S. (2013). ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *Journal of Experimental Botany*, 65, 1241–1257.
- Brandt, R., Lomonosova, M., Weising, K., Wagner, N., & Freitag, H. (2015). Phylogeny and biogeography of *Suaeda* subg. *Brezia* (Chenopodiaceae/Amaranthaceae) in the Americas. *Plant systematics and evolution*, 301(10), 2351-2375.
- Brouquisse, R., Weigel, P., Rhodes, D., Yocum, C. F., & Hanson, A. D. (1989). Evidence for a ferredoxin-dependent choline monooxygenase from spinach chloroplast stroma. *Plant Physiology*, 90(1), 322-329.
- Brown, J. J., Glenn, E. P., Fitzsimmons, K. M., & Smith, S. E. (1999). Halophytes for the treatment of saline aquaculture effluent. *Aquaculture*, 175(3-4), 255-268.
- Cabot, C., Sibole, J. V., Barceló, J., & Poschenrieder, C. (2014). Lessons from crop plants struggling with salinity. *Plant Science*, 226, 2-13.
- Cao, J., Lv, X. Y., Chen, L., Xing, J. J., & Lan, H. Y. (2015). Effects of salinity on the growth, physiology and relevant gene expression of an annual halophyte grown from heteromorphic seeds. *AoB Plants*, 7.
- Cao, J., Wang, L., & Lan, H. (2016). Validation of reference genes for quantitative RT-PCR normalization in *Suaeda aralocaspica*, an annual halophyte with heteromorphism and C4 pathway without Kranz anatomy. *PeerJ*, 4, e1697.
- Ceccardi, T. L., Barthe, G. A., & Derrick, K. S. (1998). A novel protein associated with citrus blight has sequence similarities to expansin. *Plant Molecular Biology*, 38:775-783.
- Charron, J. B. F., Breton, G., Danyluk, J., Muzac, I., Ibrahim, R. K., & Sarhan, F. (2002). Molecular and Biochemical Characterization of a Cold-Regulated PhosphoethanolamineN-Methyltransferase from Wheat. *Plant physiology*, 129(1), 363-373.
- Chen, M., Cao, J., Zheng, C., & Liu, Q. (2006). Directed evolution of an artificial bifunctional enzyme, γ -glutamyl kinase/ γ -glutamyl phosphate reductase, for improved osmotic tolerance of *Escherichia coli* transformants. *FEMS microbiology letters*, 263(1), 41-47.

- Chen, M., Wei, H., Cao, J., Liu, R., Wang, Y., & Zheng, C. (2007). Expression of *Bacillus subtilis* proBA genes and reduction of feedback inhibition of proline synthesis increases proline production and confers osmotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *BMB Reports*, 40(3), 396-403.
- Chen, T. H., & Murata, N. (2002). Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Current opinion in plant biology*, 5(3), 250-257.
- Cherian, S., & Reddy, M. P. (2003). Evaluation of NaCl tolerance in the callus cultures of *Suaeda nudiflora* Moq. *Biologia Plantarum*, 46(2), 193.
- Cosgrove, D. J. (2001). Wall structure and wall loosening. A look backwards and forwards. *Plant physiology*, 125(1), 131-134.
- Csonka, L. N., & Hanson, A. D. (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annual review of microbiology*, 45(1), 569-606.
- Delauney, A. J., & Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The plant journal*, 4(2), 215-223.
- Drozdowicz, Y. M., & Rea, P. A. (2001). Vacuolar H⁺ pyrophosphatases: from the evolutionary backwaters into the mainstream. *Trends in plant science*, 6(5), 206-211.
- Dubouzet, J. G., Sakuma, Y., Ito, Y., Kasuga, M., Dubouzet, E. G., Miura, S., ... & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *The Plant Journal*, 33(4), 751-763.
- Fan, W., Zhang, M., Zhang, H., & Zhang, P. (2012). Improved tolerance to various abiotic stresses in transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas*) expressing spinach betaine aldehyde dehydrogenase. *PLoS One*, 7(5), e37344.
- Ferren, W. R., & Schenk, H. J. (2004). *Suaeda*. En: Flora of North America Editorial Committee Ed. Flora of North America. North of Mexico. Vol. 4, pp. 390-398, Oxford University Press, Nueva York.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
- Flowers, T. J. (2004). Improving crop salt tolerance. *Journal of Experimental botany*, 55(396), 307-319.
- Flowers, T. J., & Colmer, T. D. (2008). Salinity tolerance in halophytes. *New Phytologist*, 179(4), 945-963.

- Flowers, T. J., & Hall, J. L. (1978). Salt tolerance in the halophyte, *Suaeda maritima* (L.) Dum.: the influence of the salinity of the culture solution on the content of various organic compounds. *Annals of Botany*, 42(5), 1057-1063.
- Fricke, W., & Peters, W. S. (2002). The biophysics of leaf growth in salt-stressed barley. A study at the cell level. *Plant Physiology*, 129(1), 374-388.
- Fricke, W., Akhilarova, G., Veselov, D., & Kudoyarova, G. (2004). Rapid and tissue-specific changes in ABA and in growth rate in response to salinity in barley leaves. *Journal of Experimental Botany*, 55(399), 1115-1123.
- Fukuda, A., Yazaki, Y., Ishikawa, T., Koike, S., & Tanaka, Y. (1998). Na⁺/H⁺ antiporter in tonoplast vesicles from rice roots. *Plant and Cell Physiology*, 39(2), 196-201.
- Garg, A. K. et al. (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 15898–15903
- Garzón, P., & García, M. (2011). Efecto del estrés por NaCl sobre la anatomía radical y foliar en dos genotipos de Frijol (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Bioagro*, 23(3), 153-160.
- Geer, L. Y., Domrachev, M., Lipman, D. J., & Bryant, S. H. (2002). CDART: protein homology by domain architecture. *Genome research*, 12(10), 1619-1623.
- Geilfus, C. M., Mithöfer, A., Ludwig-Müller, J., Zörb, C., & Muehling, K. H. (2015). Chloride-inducible transient apoplastic alkalinizations induce stomata closure by controlling abscisic acid distribution between leaf apoplast and guard cells in salt-stressed *Vicia faba*. *New Phytologist*, 208(3), 803-816.
- George, E. F., Hall, M. A., & De Klerk, G. J. (2008). The components of plant tissue culture media II: organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In *Plant propagation by tissue culture* (pp. 115-173). Springer, Dordrecht.
- Ginzberg, I., Stein, H., Kapulnik, Y., Szabados, L., Strizhov, N., Schell, J., ... & Zilberstein, A. (1998). Isolation and characterization of two different cDNAs of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa, transcriptionally induced upon salt stress. *Plant Molecular Biology*, 38(5), 755-764.
- Glenn, E. P., Anday, T., Chaturvedi, R., Martinez-Garcia, R., Pearlstein, S., Soliz, D., ... & Felger, R. S. (2013). Three halophytes for saline-water agriculture: An oilseed, a forage and a grain crop. *Environmental and Experimental Botany*, 92, 110-121.
- Glenn, E. P., Brown, J. J., & Blumwald, E. (1999). Salt tolerance and crop potential of halophytes. *Critical reviews in plant sciences*, 18(2), 227-255.
- Groß, F., Durner, J., & Gaupels, F. (2013). Nitric oxide, antioxidants and prooxidants in plant defence responses. *Frontiers in plant science*, 4, 419.

- Grondin, A., Rodrigues, O., Verdoucq, L., Merlot, S., Leonhardt, N., & Maurel, C. (2015). Aquaporins contribute to ABA-triggered stomatal closure through OST1-mediated phosphorylation. *The Plant Cell*, 27(7), 1945-1954.
- Guo, S., Yin, H., Zhang, X., Zhao, F., Li, P., Chen, S., ... & Zhang, H. (2006). Molecular cloning and characterization of a vacuolar H⁺-pyrophosphatase gene, SsVP, from the halophyte *Suaeda salsa* and its overexpression increases salt and drought tolerance of *Arabidopsis*. *Plant molecular biology*, 60(1), 41-50.
- Gupta, K., Jha, B., & Agarwal, P. K. (2014). A dehydration-responsive element binding (DREB) transcription factor from the succulent halophyte *Salicornia brachiata* enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Marine biotechnology*, 16(6), 657-673.
- Gurudeeban, S., Ramanathan, T., Satyavani, K., & Dhinesh, T. (2011). Standardization of DNA isolation and PCR protocol for RAPD analysis of *Suaeda* sp. *Asian Journal of Biotechnology*, 3(5), 486-492.
- Hall, J. L., Harvey, D. M., & Flowers, T. J. (1978). Evidence for the cytoplasmic localization of betaine in leaf cells of *Suaeda maritima*. *Planta*, 140(1), 59-62.
- Handa, S., Handa, A. K., Hasegawa, P. M., & Bressan, R. A. (1986). Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. *Plant physiology*, 80(4), 938-945.
- Hare, P. D., & Cress, W. A. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant growth regulation*, 21(2), 79-102.
- Hare, P. D., Cress, W. A., & Van Staden, J. (1999). Proline synthesis and degradation: a model system for elucidating stress-related signal transduction. *Journal of experimental botany*, 50(333), 413-434.
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J. K., & Bohnert, H. J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant biology*, 51(1), 463-499.
- Heath, O. V. S., & Meidner, H. (1981). Feedback processes in the opening of leaf stomata in light. Proceedings of the Royal Society of London. *Series B. Biological Sciences*, 213(1191), 161-170.
- Hedrich, R. (2012). Ion channels in plants. *Physiological reviews*, 92(4), 1777-1811.
- Hedrich, R., & Geiger, D. (2017). Biology of SLAC1-type anion channels—from nutrient uptake to stomatal closure. *New Phytologist*, 216(1), 46-61.
- Hedrich, R., & Shabala, S. (2018). Stomata in a saline world. *Current opinion in plant biology*, 46, 87-95.

- Hibino, T., Meng, Y. L., Kawamitsu, Y., Uehara, N., Matsuda, N., Tanaka, Y., ... & Ishii, T. (2001). Molecular cloning and functional characterization of two kinds of betaine-aldehyde dehydrogenase in betaine-accumulating mangrove *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. *Plant molecular biology*, 45(3), 353-363.
- Hibino, T., Waditee, R., Araki, E., Ishikawa, H., Aoki, K., Tanaka, Y., & Takabe, T. (2002). Functional characterization of choline monooxygenase, an enzyme for betaine synthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 277(44), 41352-41360.
- Hiyama, A., Takemiya, A., Munemasa, S., Okuma, E., Sugiyama, N., Tada, Y., ... & Shimazaki, K. I. (2017). Blue light and CO₂ signals converge to regulate light-induced stomatal opening. *Nature communications*, 8(1), 1-13.
- Hong, Z., Lakkineni, K., Zhang, Z., & Verma, D. P. S. (2000). Removal of feedback inhibition of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant physiology*, 122(4), 1129-1136.
- Hu, C. A., Delauney, A. J., & Verma, D. P. (1992). A bifunctional enzyme (Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(19), 9354-9358.
- Hur, J., Jung, K. H., Lee, C. H., & An, G. (2004). Stress-inducible *OsP5CS2* gene is essential for salt and cold tolerance in rice. *Plant Science*, 167(3), 417-426.
- Hussain SS, Iqbal MT, Arif MA, Amjad M. Beyond osmolytes and transcription factors: drought tolerance in plants via protective proteins and aquaporins. *Biologia Plantarum*, 2011;55:401–13.
- Ibrahim, R. K., & Muzac, I. (2000). The methyltransferase gene superfamily: a tree with multiple branches. *Recent advances in phytochemistry*, 34, 349-384.
- Imes, D., Mumm, P., Böhm, J., Al-Rasheid, K. A., Marten, I., Geiger, D., & Hedrich, R. (2013). Open stomata 1 (OST 1) kinase controls R-type anion channel QUAC 1 in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal*, 74(3), 372-382.
- Jacobs, M., Angenon, G., Hermans, C., Thu, T. T., & Roosens, N. H. (2003). Proline accumulation and Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene properties in three rice cultivars differing in salinity and drought tolerance. *Plant Science*, 165(5), 1059-1068.
- Jiamsomboon, K., Treesuwan, W., & Boonyalai, N. (2012). Dissecting substrate specificity of two rice BADH isoforms: Enzyme kinetics, docking and molecular dynamics simulation studies. *Biochimie*, 94(8), 1773-1783.

- Jin, H., Dong, D., Yang, Q., & Zhu, D. (2016). Salt-responsive transcriptome profiling of *Suaeda glauca* via RNA sequencing. *PLoS one*, 11(3), e0150504.
- Joshi, M., Mishra, A., & Jha, B. (2012). NaCl plays a key role for in vitro micropropagation of *Salicornia brachiata*, an extreme halophyte. *Industrial crops and products*, 35(1), 313-316.
- Kagan, R. M., & Clarke, S. (1994). Widespread occurrence of three sequence motifs in diverse S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases suggests a common structure for these enzymes. *Archives of biochemistry and biophysics*, 310(2), 417-427.
- Kamps, M. P., Taylor, S. S., & Sefton, B. M. (1984). Direct evidence that oncogenic tyrosine kinases and cyclic AMP-dependent protein kinase have homologous ATP-binding sites. *Nature*, 310(5978), 589.
- Kapilan, R., Vaziri, M., & Zwiazek, J. J. (2018). Regulation of aquaporins in plants under stress. *Biological research*, 51(1), 4.
- Karakas, B., Ozias-Akins, P., Stushnoff, C., Suefferheld, M. & Rieger, M. (1997). Salinity and drought tolerance in mannitol-accumulating transgenic tobacco. *Plant Cell Environ* (20)609–616.
- Ke-Fu, Z. (1991). Desalinization of saline soils by *Suaeda salsa*. *Plant and soil*, 135(2), 303-305.
- Khan, M. A., Ungar, I. A., Showalter, A. M., & Dewald, H. D. (1998). NaCl-induced accumulation of glycinebetaine in four subtropical halophytes from Pakistan, *Physiologia Plantarum*, 102 (4), 487-492.
- Khan, M. A., Ungar, I. A., & Showalter, A. M. (1999). Effects of salinity on growth, ion content, and osmotic relations in *Halopyrum mucronatum* (L.) Stapf. *Journal of Plant Nutrition*, 22(1), 191-204.
- Khan, M. A., Ungar, I. A., & Showalter, A. M. (2000a). The effect of salinity on the growth, water status, and ion content of a leaf succulent perennial halophyte, *Suaeda fruticosa* (L.) Forssk. *Journal of Arid Environments*, 45(1), 73-84.
- Khan, M. A., Ungar, I. A., & Showalter, A. M. (2000b). Effects of sodium chloride treatments on growth and ion accumulation of the halophyte *Haloxylon recurvum*. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 31(17-18), 2763-2774.
- Khatkar, D., & Kuhad, M. S. (2000). Short-term salinity induced changes in two wheat cultivars at different growth stages. *Biologia Plantarum*, 43(4), 629-632.
- Kim, Y., Kim, E. J., & Rea, P. A. (1994). Isolation and characterization of cDNAs encoding the vacuolar H⁺-pyrophosphatase of *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 106(1), 375-382.

- Kishor, P. K., Hong, Z., Miao, G. H., Hu, C. A. A., & Verma, D. P. S. (1995). Overexpression of [δ]-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant physiology*, 108(4), 1387-1394.
- Kirch, H. H., Vera-Estrella, R., Gollack, D., Quigley, F., Michalowski, C. B., Barkla, B. J., & Bohnert, H. J. (2000). Expression of water channel proteins in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiology*, 123(1), 111-124.
- Koiwa, H., Bressan, R. A., & Hasegawa, P. M. (2006). Identification of plant stress-responsive determinants in *Arabidopsis* by large-scale forward genetic screens. *Journal of Experimental Botany*, 57(5), 1119-1128.
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.
- Kuttan, S., Sankararamasubramanian, H. M., & Parida, A. K. (2018). Choline monooxygenase transcript expression triggers glycine betaine accumulation in *Suaeda maritima* when subjected to a salt concentration optimal for its growth. bioRxiv, 314419.
- Lata, C., & Prasad, M. (2011). Role of DREBs in regulation of abiotic stress responses in plants. *Journal of experimental botany*, 62(14), 4731-4748.
- Li, Q.L., Zhang, Y., Yin, H., & Li, D. (2006). Isolation of BADH gene promoter from *Suaeda liaotungensis* and its sequence analysis. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*, 22(1) 77-81.
- Li, Y., Jones, L., & McQueen-Mason, S. (2003). Expansins and cell growth. *Current opinion in plant biology*, 6(6), 603-610.
- Lim, C. C., Liu, J. Z., & Pua, E. C. (2002). Characterization of S-adenosylmethionine synthetase genes and its expression is associated with ethylene synthesis in mustard (*Brassica juncea*). *Physiologia Plantarum*, 116(4), 522-530.
- Lin, X., Shen, J., Liu, K., & Huang, X. (2005). Study on remediation effects of *Suaeda salsa* L. planting on coastal saline soil. *Advances in Marine Science*, 23(1), 65-69.
- Maathuis, F. J., Ahmad, I., & Patishtan, J. (2014). Regulation of Na⁺ fluxes in plants. *Frontiers in plant science*, 5, 467.
- Marten, H., Konrad, K. R., Dietrich, P., Roelfsema, M. R. G., & Hedrich, R. (2007). Ca²⁺-dependent and-independent abscisic acid activation of plasma membrane anion channels in guard cells of *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology*, 143(1), 28-37.

- McCue, K. F., & Hanson, A. D. (1992). Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression. *Plant molecular biology*, 18(1), 1-11.
- McNeil, S. D., Rhodes, D., Russell, B. L., Nuccio, M. L., Shachar-Hill, Y., & Hanson, A. D. (2000). Metabolic modeling identifies key constraints on an engineered glycine betaine synthesis pathway in tobacco. *Plant physiology*, 124(1), 153-162.
- McQueen-Mason, S., Durachko, D. M., & Cosgrove, D. J. (1992). Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants. *The Plant Cell*, 4(11), 1425-1433.
- Miyoshi, K., Matsuura, H., Kumon, T., Matsuda, K., Yoshikawa, T., Bamba, T., ... & Hirata, K. (2011). Isolation and partial characterization of the *Chlamydomonas reinhardtii* γ -glutamyl kinase. *Journal of bioscience and bioengineering*, 112(1), 75-78.
- Moghaieb, R. E., Saneoka, H., & Fujita, K. (2004). Effect of salinity on osmotic adjustment, glycinebetaine accumulation and the betaine aldehyde dehydrogenase gene expression in two halophytic plants, *Salicornia europaea* and *Suaeda maritima*. *Plant science*, 166(5), 1345-1349.
- Munns, R., Schachtman, D. P., & Condon, A. G. (1995). The significance of a two-phase growth response to salinity in wheat and barley. *Functional Plant Biology*, 22(4), 561-569.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia plantarum*, 15(3), 473-497.
- Nakanishi, Y., & Maeshima, M. (1998). Molecular cloning of vacuolar H⁺-pyrophosphatase and its developmental expression in growing hypocotyl of mung bean. *Plant physiology*, 116(2), 589-597.
- Nakashima K, K Yamaguchi-Shinozaki (2010) Promoters and transcription factors in abiotic stress-responsive gene expression. In *Abiotic stress adaptation in plants* (pp. 199-216). Springer, Dordrecht.
- Nakashima K, Y Ito, K Yamaguchi-Shinozaki (2009) Transcriptional regulatory networks in response to abiotic stresses in *Arabidopsis* and grasses. *Plant Physiology* 149(1), 88-95.
- Nicolas, M. E., Munns, R., Samarakoon, A. B., & Gifford, R. M. (1993). Elevated CO₂ improves the growth of wheat under salinity. *Functional Plant Biology*, 20(3), 349-360.

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Nielsen, M., Lundegaard, C., Lund, O., & Petersen, T. N. (2010). CPHmodels-3.0—remote homology modeling using structure-guided sequence profiles. *Nucleic acids research*, 38(suppl_2), W576-W581.
- Noctor, G., & Foyer, C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annual review of plant biology*, 49(1), 249-279.
- Noguez-Hernández, R., Carballo-Carballo, A., & Flores-Olvera, H. (2013). *Suaeda edulis* (Chenopodiaceae), una nueva especie de lagos salinos del centro de México. *Botanical Sciences*, 91(1), 19-25.
- Nuccio, M. L., Russell, B. L., Nolte, K. D., Rathinasabapathi, B., Gage, D. A., & Hanson, A. D. (1998). The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monooxygenase. *The Plant Journal*, 16(4), 487-496.
- Park, J., Okita, T. W., & Edwards, G. E. (2009). Salt tolerant mechanisms in single-cell C4 species *Bienertia sinuspersici* and *Suaeda aralocaspica* (Chenopodiaceae). *Plant Science*, 176(5), 616-626.
- Peng, Y., Lin, W., Cai, W., & Arora, R. (2007). Overexpression of a Panax ginseng tonoplast aquaporin alters salt tolerance, drought tolerance and cold acclimation ability in transgenic *Arabidopsis* plants. *Planta*, 226(3), 729-740.
- Pérez-Arellano, I., Carmona-Álvarez, F., Martínez, A. I., Rodríguez-Díaz, J., & Cervera, J. (2010). Pyrroline-5-carboxylate synthase and proline biosynthesis: From osmotolerance to rare metabolic disease. *Protein Science*, 19(3), 372-382.
- Petterson, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry*, 25(13), 1605-1612.
- Pitann, B., Zörb, C., & Mühling, K. H. (2009). Comparative proteome analysis of maize (*Zea mays* L.) expansins under salinity. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 172(1), 75-77.
- Pulla, R. K., Kim, Y. J., Parvin, S., Shim, J. S., Lee, J. H., Kim, Y. J., ... & Yang, D. C. (2009). Isolation of S-adenosyl-L-methionine synthetase gene from Panax ginseng CA meyer and analysis of its response to abiotic stresses. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 15(3), 267.
- Raschke, K. (1975). Stomatal action. *Annual Review of Plant Physiology*, 26(1), 309-340.
- Rhodes, D. F., & Hanson, A. D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual review of plant biology*, 44(1), 357-384.

- Roelfsema, M. R. G., & Hedrich, R. (2005). In the light of stomatal opening: new insights into 'the Watergate'. *New Phytologist*, 167(3), 665-691.
- Rodrigues, M. I., Takeda, A. A., Bravo, J. P., & Maia, I. G. (2016). The eucalyptus tonoplast intrinsic protein (TIP) gene subfamily: genomic organization, structural features, and expression profiles. *Frontiers in plant science*, 7, 1810.
- Rosnow, J., Offermann, S., Park, J., Okita, T. W., Tarlyn, N., Dhingra, A., & Edwards, G. E. (2011). In vitro cultures and regeneration of *Bienertia sinuspersici* (Chenopodiaceae) under increasing concentrations of sodium chloride and carbon dioxide. *Plant cell reports*, 30(8), 1541-1553.
- Rozema, J., & Flowers, T. (2008). Crops for a salinized world. *Science*, 1478-1480.
- Rozema, J., & Schat, H. (2013). Salt tolerance of halophytes, research questions reviewed in the perspective of saline agriculture. *Environmental and Experimental Botany*, 92, 83-95.
- Sabirzhanova, I. B., Sabirzhanov, B. E., Chemeris, A. V., Veselov, D. S., & Kudoyarova, G. R. (2005). Fast changes in expression of expansin gene and leaf extensibility in osmotically stressed maize plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(4), 419-422.
- Sahu, B. B., & Shaw, B. P. (2009). Isolation, identification and expression analysis of salt-induced genes in *Suaeda maritima*, a natural halophyte, using PCR-based suppression subtractive hybridization. *BMC Plant Biology*, 9(1), 69.
- Saibo, N. J., Lourenço, T., & Oliveira, M. M. (2009). Transcription factors and regulation of photosynthetic and related metabolism under environmental stresses. *Annals of botany*, 103(4), 609-623.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular biology and evolution*, 4(4), 406-425.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J. G., Abe, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration-and cold-inducible gene expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 290(3), 998-1009.
- Sambrook, J.F., & Russell, D.W., ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001, 2100 pp., soft cover. ISBN-10 0-87969-577-3. ISBN-13 978-0-87969-577-4.
- Sanders, D., Brownlee, C., & Harper, J. F. (1999). Communicating with calcium. *The Plant Cell*, 11(4), 691-706.

- Saneoka, H., Shiota, K., Kurban, H., Chaudhary, M. I., Premachandra, G. S., & Fujita, K. (1999). Effect of salinity on growth and solute accumulation in two wheat lines differing in salt tolerance. *Soil science and plant nutrition*, 45(4), 873-880.
- Santarius, K. A. (1992). Freezing of isolated thylakoid membranes in complex media. VIII. Differential cryoprotection by sucrose, proline and glycerol. *Physiologia Plantarum*, 84(1), 87-93.
- Sarowar, S., Kim, E. N., Kim, Y. J., Ok, S. H., Kim, K. D., Hwang, B. K., & Shin, J. S. (2005). Overexpression of a pepper ascorbate peroxidase-like 1 gene in tobacco plants enhances tolerance to oxidative stress and pathogens. *Plant Science*, 169(1), 55-63.
- Schütze, P., Freitag, H., & Weising, K. (2003). An integrated molecular and morphological study of the subfamily Suaedoideae Ulbr.(Chenopodiaceae). *Plant Systematics and Evolution*, 239(3-4), 257-286.
- Schwarz, R., & Dayhoff, M., (1979). In: Dayhoff M (ed) Atlas of protein sequences. National Biomedical Research Foundation 1979, pp 353-58.
- Serrano, R., Mulet, J. M., Rios, G., Marquez, J. A., De Larrinoa, I. F., Leube, M. P., ... & Montesinos, C. (1999). A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of experimental botany*, 1023-1036.
- Sah, S.K., Reddy, K. R., & Li, J. (2016). Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. *Frontiers in plant science*, 7, 571.
- Shabala, S. (2013). Learning from halophytes: physiological basis and strategies to improve abiotic stress tolerance in crops. *Annals of botany*, 112(7), 1209-1221.
- Shabala, S., Hariadi, Y., & Jacobsen, S. E. (2013). Genotypic difference in salinity tolerance in quinoa is determined by differential control of xylem Na⁺ loading and stomatal density. *Journal of Plant Physiology*, 170(10), 906-914.
- Shen, H., Yin, Y., Chen, F., Xu, Y., & Dixon, R. A. (2009). A bioinformatic analysis of NAC genes for plant cell wall development in relation to lignocellulosic bioenergy production. *BioEnergy Research*, 2(4), 217.
- Singh, M., Singh, A., Prasad, S. M., & Singh, R. K. (2017). Regulation of plants metabolism in response to salt stress: an omics approach. *Acta Physiologiae Plantarum*, 39(2), 48.
- Sleimi, N., Guerfali, S., & Bankaji, I. (2015). Biochemical indicators of salt stress in *Plantago maritima*: Implications for environmental stress assessment. *Ecological indicators*, 48, 570-577.

- Song, J., & Wang, B. (2015). Using euhalophytes to understand salt tolerance and to develop saline agriculture: *Suaeda salsa* as a promising model. *Annals of Botany*, 115(3), 541-553.
- Song, J., Feng, G., Tian, C. Y., & Zhang, F. S. (2006). Osmotic adjustment traits of *Suaeda physophora*, *Haloxylon ammodendron* and *Haloxylon persicum* in field or controlled conditions. *Plant Science*, 170(1), 113-119.
- Summers, P. S., & Weretilnyk, E. A. (1993). Choline synthesis in spinach in relation to salt stress. *Plant physiology*, 103(4), 1269-1276.
- Tabuchi, T., Kawaguchi, Y., Azuma, T., Nanmori, T., & Yasuda, T. (2005). Similar regulation patterns of choline monooxygenase, phosphoethanolamine N-methyltransferase and S-adenosyl-L-methionine synthetase in leaves of the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Plant and cell physiology*, 46(3), 505-513.
- Taji, T., Ohsumi, C., Iuchi, S., Seki, M., Kasuga, M., Kobayashi, M., ... & Shinozaki, K. (2002). Important roles of drought-and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 29(4), 417-426.
- Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology advances*, 26(6), 618-631.
- Tipirdamaz, R., Gagneul, D., Duhazé, C., Aïnouche, A., Monnier, C., Özkum, D., & Larher, F. (2006). Clustering of halophytes from an inland salt marsh in Turkey according to their ability to accumulate sodium and nitrogenous osmolytes. *Environmental and Experimental Botany*, 57(1-2), 139-153.
- Van Breusegem, F., Dekeyser, R., Gielen, J., Van Montagu, M., & Caplan, A. (1994). Characterization of a S-adenosylmethionine synthetase gene in rice. *Plant Physiology*, 105(4), 1463.
- Ventura, Y., & Sagi, M. (2013). Halophyte crop cultivation: the case for *Salicornia* and *Sarcocornia*. *Environmental and Experimental Botany*, 92, 144-153.
- Wang, B., Lüttge, U., & Ratajczak, R. (2001). Effects of salt treatment and osmotic stress on V-ATPase and V-PPase in leaves of the halophyte *Suaeda salsa*. *Journal of Experimental Botany*, 52(365), 2355-2365.
- Wang, F. W., Wang, M. L., Guo, C., Wang, N., Li, X. W., Chen, H., ... & Li, H. Y. (2016). Cloning and characterization of a novel betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda corniculata*. *Genetic and Molecular Research*, 15.
- Wang, L. Y., & Zhao, K. F. (2004). Effect of NaCl stress on ion compartmentation, photosynthesis and growth of *Salicornia bigelovii* Torr. *Zhi wu sheng li yu fen zi*

- sheng wu xue xue bao= *Journal of plant physiology and molecular biology*, 30(1), 94-98.
- Wang, X. C., Chang, L. L., Wang, B. C., Wang, D., Li, P. H., et al. (2013). Comparative proteomics of *Thellungiella halophila* leaves from plants subjected to salinity reveals the importance of chloroplastic starch and soluble sugars in halophyte salt tolerance. *Molecular Cell Proteomics* (12)2174–2195.
- Wang, Y., & Nii, N. (2000). Changes in chlorophyll, ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 75(6), 623-627.
- Wang, X., Li, Y., Ji, W., Bai, X., Cai, H., Zhu, D., ... & Zhu, Y. M. (2011). A novel *Glycine soja* tonoplast intrinsic protein gene responds to abiotic stress and depresses salt and dehydration tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Journal of plant physiology*, 168(11), 1241-1248.
- Weigel, P., Weretilnyk, E. A., & Hanson, A. D. (1986). Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplasts. *Plant Physiology*, 82(3), 753-759.
- 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(7), 2745-2749.
- Wongpanya, R., Boonyalai, N., Thammachuchourat, N., Horata, N., Arikrit, S., Myint, K. M., ... & Choowongkamon, K. (2011). Biochemical and enzymatic study of rice BADH wild-type and mutants: an insight into fragrance in rice. *The protein journal*, 30(8), 529-538.
- Yamauchi, S., Takemiya, A., Sakamoto, T., Kurata, T., Tsutsumi, T., Kinoshita, T., & Shimazaki, K. I. (2016). The plasma membrane H⁺-ATPase AHA1 plays a major role in stomatal opening in response to blue light. *Plant physiology*, 171(4), 2731-2743.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., & Somero, G. N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science*, 217(4566), 1214-1222.
- Yeo, A. R., Lee, A. S., Izard, P., Boursier, P. J., & Flowers, T. J. (1991). Short-and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany*, 42(7), 881-889.
- Yoon, G. S., Ko, K. H., Kang, H. W., Suh, J. W., Kim, Y. S., & Ryu, Y. W. (2006). Characterization of S-adenosylmethionine synthetase from *Streptomyces*

- avermililis* NRRL8165 and its effect on antibiotic production. *Enzyme and microbial technology*, 39(3), 466-473.
- Yu, J., Chen, S., Zhao, Q., Wang, T., Yang, C., Diaz, C., ... & Dai, S. (2011). Physiological and proteomic analysis of salinity tolerance in *Puccinellia tenuiflora*. *Journal of Proteome Research*, 10(9), 3852-3870.
- Zhang, C. S., Lu, Q., & Verma, D. P. S. (1995). Removal of feedback inhibition of Δ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 270(35), 20491-20496.
- Zhang, J. L., & Shi, H. (2013). Physiological and molecular mechanisms of plant salt tolerance. *Photosynthesis research*, 115(1), 1-22.
- Zhang, L., Ma, X. L., Zhang, Q., Ma, C. L., Wang, P. P., Sun, Y. F., ... & Zhang, H. (2001). Expressed sequence tags from a NaCl-treated *Suaeda salsa* cDNA library. *Gene*, 267(2), 193-200.
- Zhang, X., Liu, X., Wu, L., Yu, G., Wang, X., & Ma, H. (2015). The SsDREB transcription factor from the succulent halophyte *Suaeda salsa* enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *International journal of genomics*, 2015.
- Zhang, Y., Yin, H., Li, D., Zhu, W., & Li, Q. (2008). Functional analysis of BADH gene promoter from *Suaeda liaotungensis* K. *Plant cell reports*, 27(3), 585.
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53(1), 247-273.

ANEXOS

Preparación del medio de cultivo MS

Macronutrientes:

Nitrato de potasio 1900 mg/L

Nitrato de amonio 1650 mg/L

Sulfato de magnesio 370 mg/L

Fosfato monobásico de potasio 170 mg/L

Micronutrientes:

ácido bórico 6.2 mg/L

Sulfato de Zinc 8.6 mg/L

Sulfato de cobre 0.025 mg/L

Sulfato de cobalto 0.025 mg/L

Molibdato de sodio 0.25 mg/L

Sulfato de manganeso 22.30 mg/L

Ioduro de potasio 0.83 mg/L

Cloruro de calcio 440 mg/L

Sulfato ferroso 27.8 mg/L

ácido etilendiaminotertaacético 37.3 mg/L

Aditivos organicos:

ácido nicotínico 0.5 mg/L

Piridoxina 0.5 mg/L

Tiamina 0.1 mg/L

mio-inositol 100 mg/L

Pesar todos los componentes del medio de cultivo y disolverlos en agua destilada, adicionar 30 g/L de sacarosa y agitar hasta su completa disolución.

Ajustar el pH a 5.8 y esterilizar a 121°C por 15 minutos.