

---

---

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO EL HOMBRE Y SU AMBIENTE  
LICENCIATURA EN BIOLOGÍA  
  
PARA OBTENER EL GRADO DE  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA  
POR ACTIVIDADES RELACIONADAS CON LA PROFESIÓN

**“Tolerancia a salinidad de líneas transgénicas  
de *Arabidopsis thaliana* L. que sobre-expresan una  
proteína LEA de amaranto”**

QUE PRESENTA LA ALUMNA

**Ruth Isabel Flores Guevara**

Matrícula

2173026869

ASESORES



M. en C. Aída Marisa Osuna Fernández  
UAM-Xochimilco, Depto. el Hombre y su Ambiente.  
No. Económico 18057  
Asesor interno



Dr. Ángel Arturo Guevara García  
Instituto de Biotecnología, UNAM  
Asesor externo

México, Ciudad de México

Fecha: 10 de agosto 2022

## Resumen

Las plantas se enfrentan constantemente a condiciones de estrés de las cuales, por su naturaleza sésil, no pueden escapar. De entre ellas, el déficit hídrico, asociado tanto a la escasez de agua, como a altas concentraciones de salinidad y bajas temperaturas, es una de las más importantes. En estas condiciones estresantes, las proteínas LEA (del inglés Late Embryogenesis Abundant) y el ácido abscísico (ABA), son parte de los mecanismos que les permiten a las plantas un mayor rango de tolerancia. Durante el servicio social se evaluó la respuesta de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* L. que sobre-expresan una proteína LEA de *Amaranthus cruentus* L. (*AcLEA*) a diferentes concentraciones de NaCl y ABA. Inicialmente, se determinó la viabilidad de las semillas de las líneas transgénicas, sembrándolas en medios de cultivo basales y posteriormente se evaluaron los efectos del NaCl y el ABA sembrándolas en medios suplementados. Se llevaron a cabo curvas de dosis-respuesta de plantas tipo silvestre, para determinar aquellas concentraciones útiles para realizar los experimentos con las líneas transgénicas. En todos los casos probados, no hubo diferencia significativa entre las plántulas silvestres y las plántulas de *AcLEA* a NaCl y ABA, por lo que es probable que la aparente sobreexpresión de este gen no confiere ninguna ventaja contra el déficit hídrico. Sin embargo, aún queda pendiente de demostrarse la sobreexpresión del gen *AcLEA* en las líneas transgénicas, bajo estudio.

**Palabras clave:** *A. thaliana*, salinidad, proteínas LEA, ácido abscísico, déficit hídrico.

## ÍNDICE

Marco institucional .....	4
Introducción.....	4
Ubicación geográfica.....	8
Objetivo general .....	9
Especificación y fundamento de las actividades desarrolladas .....	9
Impacto de las actividades .....	12
Aprendizaje y habilidades obtenidas .....	13
Fundamento de las actividades desarrolladas.....	14

Agradecimientos

Referencias

## **I. Marco institucional**

El IBt (Instituto de Biotecnología, UNAM) conocido anteriormente como Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología (CIIGB), se fundó en 1982. En 1985 sus instalaciones se trasladaron a la ciudad de Cuernavaca, donde se ubica actualmente. En 1991, por acuerdo del Consejo Universitario, el CIIGB fue transformado en el IBt de la UNAM, como resultado de la maduración y consolidación de su comunidad académica.

El instituto está conformado por cinco departamentos: Bioingeniería, Biología Molecular de Plantas, Genética y Fisiología Molecular, Microbiología Molecular, y Reconocimiento Molecular y Bioestructura, enfocados a desarrollar biotecnología de frontera a partir de investigaciones de excelencia académica, que paralelamente repercute en la formación de recursos humanos especializados. El servicio social fue realizado en el departamento de Biología Molecular de Plantas.

Tomando en cuenta que la misión de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco (UAM-X) es “formar biólogos cuyas habilidades, competencias y conocimientos les permitan participar en el diagnóstico, gestión y planeación del uso, conservación y restauración de los recursos naturales”, es importante que los egresados participen en proyectos de investigación que les ayuden a ampliar y diversificar sus conocimientos en disciplinas relacionadas con la carrera, como es el caso de la biología molecular de plantas, que posteriormente puedan ser aplicados en otras áreas de conocimiento, contribuyendo a su formación integral y fomentando la multidisciplinariedad.

## **II. Introducción**

A lo largo de su ciclo vital, las plantas están expuestas a una gran cantidad de condiciones estresantes, provocadas por factores bióticos (bacterias, hongos, virus, insectos, otras plantas, animales, etc.) y factores abióticos (sequía, exceso de sales en el suelo, calor, frío, contaminantes ambientales, viento, deficiencia de minerales, etc.). Estos factores de estrés ejercen una influencia negativa sobre el desarrollo

óptimo de la planta (Benavides, 2002). La respuesta de las plantas a distintos tipos de estrés incluye diversos mecanismos, entre los que la alteración en la expresión genes, que determina el aumento o la disminución de proteínas en función de la naturaleza, duración y severidad del estrés, son particularmente importantes (Moreno, 2009).

La disponibilidad de agua es el factor más importante para el adecuado desarrollo de las plantas y su carencia desencadena una importante condición de estrés, conocida como déficit hídrico. Interesantemente, el déficit hídrico no solo está asociado a la escasez del agua, sino también a las bajas temperaturas y a una elevada salinidad (Moreno, 2009). En todos los casos, la limitación de la disponibilidad de agua induce respuestas que afectan la morfología, la fisiología y el metabolismo de las plantas, como son la disminución en la síntesis de proteínas, retraso en el crecimiento, alteraciones en la respiración, la fotosíntesis y en la distribución de nutrientes (Benavides, 2002; Covarrubias-Robles, 2007).

Unas de las proteínas más importantes de respuesta de las plantas al estrés hídrico son las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), que son hidrofílicas que se acumulan abundantemente en la semilla seca y en los tejidos vegetativos (Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011), donde desempeñan un papel importante en las respuestas al estrés biótico y abiótico, aunque su función específica en estos procesos sigue siendo desconocida (Mertens *et al.*, 2018). Interesantemente, la acumulación de las proteínas LEA presenta una correlación con las condiciones adversas de limitación de agua, sugiriendo que son fundamentales en la respuesta y tolerancia de las plantas a estas condiciones (Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011).

Como ya se mencionó, las proteínas LEA son hidrofílicas que integran grupo de proteínas amplio y diverso (Cardozo y Quiriban, 2014); particularmente, con base en la similitud de sus secuencias de aminoácidos, su estructura y flexibilidad, su participación en la respuesta a condiciones adversas y en otras propiedades fisicoquímicas, se han clasificado en doce grupos (Battaglia *et al.*, 2008; Moreno,

2009). De manera general, las proteínas LEA son ricas en glicina, altamente hidrófilas, con propiedades antioxidantes, de unión a iones metálicos y confieren protección a proteínas y membranas del daño por deshidratación (Chen *et al.*, 2019; Cardozo y Quiriban, 2014). Presentan diferentes organizaciones estructurales dependiendo de la cantidad de agua disponible y del agrupamiento molecular en la célula, lo que ayuda a modular el reconocimiento de diferentes ligandos; son consideradas proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP) en soluciones acuosas, pero ante una disminución en la disponibilidad de agua y el consecuente incremento en la concentración intracelular de las macromoléculas, las proteínas LEA pueden adquirir cierta estructura plegándose en conformaciones  $\alpha$ -helicoidales, que les permite reconocer algún o algunos ligandos para de esta forma estabilizarse (Saucedo *et al.*, 2017; Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011). Las proteínas LEA fueron descritas primeramente por Dure (1989) en las semillas de algodón, donde se encontró que se acumulan en la última etapa del desarrollo de las semillas (Ju *et al.*, 2021).

Se han realizado estudios para corroborar si estas proteínas son realmente una estrategia adaptativa de las plantas ante el déficit hídrico; en *A. thaliana* se ha encontrado que, al abatir la expresión de 1, 2 o 3 proteínas LEA de un mismo grupo, existe una deficiencia en la resistencia a sequía o a estrés osmótico, apoyando que son proteínas indispensables para que las plantas puedan responder en situaciones con déficit hídrico (Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles, 2011). Por otra parte, el ácido abscísico (ABA) es una fitohormona que también desempeña un papel importante en la aclimatación de las plantas a condiciones de sequía, frío y salinidad, así como en el desarrollo de la latencia e inhibición de la germinación de semillas (Flórez y Aleixo, 2009). Además, está registrado que una característica común de los genes que codifican para proteínas LEA es que están regulados por ABA (Cardozo y Quiriban, 2014).

El amaranto es conocido por ser una planta con extraordinaria adaptabilidad para crecer en condiciones climáticas adversas, tales como altas concentraciones de salinidad (Saucedo *et al.*, 2017); dicha adaptabilidad depende de diversos

mecanismos que le confieren a la planta tolerancia a la desecación, por ejemplo, proteínas LEA, represores metabólicos o la presencia de sistemas reparadores durante la rehidratación de las semillas (Maldonado, 2014). Cumming (1999) registró de que la tolerancia a la deshidratación en el amaranto es debido a los altos niveles de proteínas LEA que se presentan en el desarrollo de la maduración tardía y en el déficit hídrico de tejidos vegetativos.

La tolerancia a la salinidad de una especie se puede determinar por la capacidad de supervivencia y la tasa de crecimiento y desarrollo en comparación con plantas que crecen en ambientes normales. La tolerancia va a depender de varios factores, como la temperatura, la composición y concentración de sales y la cantidad de agua disponible, entre otros. De manera general, puede decirse que las plantas expuestas a condiciones salinas se enfrentan a tres desafíos principales: toxicidad específica de los iones, necesidad de mantener una presión de turgencia celular y la necesidad de obtener nutrientes iónicos esenciales pese a la predominancia de iones potencialmente tóxicos en su ambiente de crecimiento (Pirola, 2018).

Las líneas transgénicas utilizadas en este trabajo son líneas de *A. thaliana* potencialmente sobre-expresoras de una proteína LEA de *A. cruentus* (*AcLEA*), (Saucedo *et al.*, 2017). *AcLEA* pertenece al Grupo 3 cuyos miembros se caracteriza por acumularse en semillas maduras y en respuesta a deshidratación, salinidad o bajas temperaturas (Battaglia *et al.*, 2008). Se ha observado que hay un incremento en la acumulación de las proteínas LEA de este grupo en hojas, tallos y raíces en plantas sometidas a estrés por salinidad (Battaglia *et al.*, 2017). Su naturaleza es hidrófila y presenta una estructura de  $\alpha$  hélice en presencia de trifluoroetanol (TFE) y su expresión está reguladas por ABA en condiciones de estrés (Battaglia *et al.*, 2008).

Se tienen registros de que la sobre-expresión de genes de proteínas LEA de distintas especies de plantas producen resistencia a diversas condiciones de estrés abiótico; por ejemplo: las plantas transgénicas de *A. thaliana* que al sobreexpresar el gen *NtLEA7-3* de *Nicotiana tabacum*, son más resistentes al estrés por frío,

sequía y salinidad (Saucedo *et al.*, 2017); o la acumulación de proteína AtLEA4 en *A. thaliana* que produce un fenotipo tolerante a la sequía (Olvera- Carrillo *et al.*, 2010); así como, la sobreexpresión de *BnLEA 4-1* de *Brassica napus* en *Escherichia coli* puede mejorar la tolerancia celular bacteriana al estrés por temperatura y sal (Dalal *et al.*, 2009).

Se conoce que *A. thaliana*, es sensible a concentraciones superiores de 40mM de NaCl, sin embargo, cuando se inducen mecanismos bioquímicos como el ajuste osmótico, la exclusión de iones a nivel radicular, la retención de iones en las vacuolas, la eliminación del exceso de sales a través de glándulas o estructuras especializadas y la pérdida de sales a través de la caída de las hojas y pérdida de los frutos, la tolerancia puede aumentar (Pirola, 2018). Considerando que *A. cruentus* (amaranto) presenta una tolerancia a la salinidad, relacionada con las proteínas LEA, en este trabajo se evaluó la tolerancia a la salinidad de seis líneas transgénicas de *A. thaliana* L. a las que se les introdujo el gen de una proteína LEA de amaranto.

### III. Ubicación geográfica

Las actividades relacionadas con la profesión se llevaron a cabo en el Instituto de Biotecnología (IBt), de la UNAM, ubicado en Avenida Universidad 2001, Chamilpa, 62210 Cuernavaca, Morelos (Fig. 1).



Figura 1. Ubicación geográfica del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Google Earth Pro, 2022).

#### **IV. Objetivo general**

Evaluar la tolerancia a la salinidad de líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* L. (AtOEAcLEAp) que sobre-expresan una proteína LEA de amaranto.

#### **V. Especificación y fundamento de las actividades desarrolladas**

Las actividades se desarrollaron en un laboratorio de Biología molecular de plantas del IBt-UNAM. Cada uno de los experimentos descrito se realizó por duplicado. Si bien, inicialmente se tenía pensado utilizar solo tres líneas transgénicas, al final se optó por evaluar las seis líneas con las que el laboratorio cuenta, con el fin de obtener un mayor número de resultados, y en su caso, ir descartando aquellas líneas que no resultarán útiles.

Por otro lado, se incluyeron experimentos de respuesta ABA, debido a que en los experimentos con NaCl no se estaban teniendo los resultados esperados y como un complemento, ya que está documentado que los genes que codifican para la proteína LEA, también lo hacen para esta fitohormona. Por último, se extrajo RNA de las líneas bajo estudio para realizar análisis de expresión mediante RT-PCR. Cada una de las actividades desarrolladas durante el servicio social se describen a continuación.

##### **- Preparación de medios de cultivo**

Para la germinación y el crecimiento de plántulas se empleó el medio de cultivo MS0.2X (Murashige y Skoog, 1962) que está compuesto por los macronutrientes y micronutrientes necesarios para el crecimiento de plantas. El medio se preparó en condiciones asépticas y para los experimentos se suplemento con L-MSO, como marcador de selección para las líneas transgénicas y con diferentes concentraciones de NaCl y ABA.

### - **Desinfección de semillas**

Para obtener un alto porcentaje de germinación de las semillas, mínima contaminación y buen crecimiento de las plántulas, las semillas antes de ser sembradas en los medios de cultivo son sometidas a un proceso de desinfección superficial (Lindsey *et al.*, 2017). Dicho proceso consistió en realizar “lavados” sucesivos con etanol (96°/4 minutos), hipoclorito de sodio (10%/4 minutos) y agua destilada esterilizada.

### - **Siembra de semillas**

Las semillas desinfectadas fueron sembradas en cajas Petri en una distribución dependiente del tipo de experimento a realizar (Fig. 2)

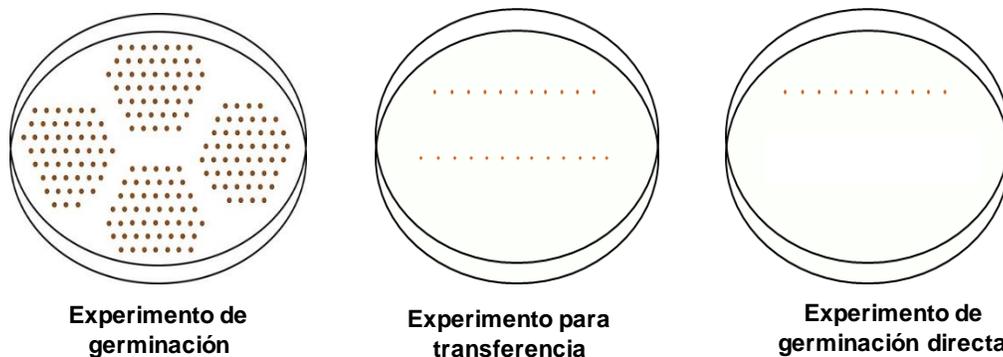


Figura 2. Tipos de siembra de semillas.

### - **Transferencia de plántulas**

Para los experimentos de transferencia se utilizaron plántulas de 7 días posteriores a la germinación (dpg), procurando transferir plántulas de una talla homogénea. Para cada experimento se eligieron 18 plántulas que fueron transferidas en 3 cajas Petri independientes (Fig. 3).

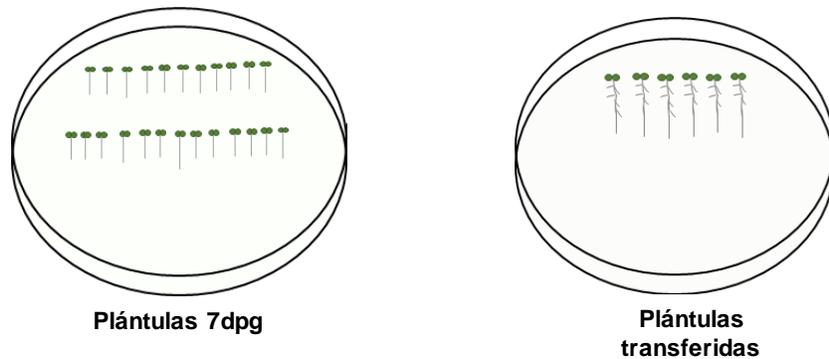


Figura 3. Transferencia de plántulas de talla similar a condiciones experimentales

#### - Verificación de las líneas transgénicas

Se sembraron plántulas en medios suplementados con L-MSO (L-metionina sulfoximina), que es un análogo inocuo del herbicida bialafos (fosfotricina) (Thompson *et al.*, 1987), al que el vector usado para la generación de las plantas transgénicas *AcLEA* confiere resistencia (pEarleyGate) (Earley *et al.*, 2006).

#### - Determinación de los porcentajes de viabilidad y germinación de las líneas bajo estudio.

Se sembraron 150 semillas de cada una de las líneas transgénicas y transcurridas 24 horas de incubación fueron observadas en el microscopio, registrando el número de semillas que emergieron de la radícula. Posteriormente, se verificaron cada 8 horas hasta que transcurrieran un total de 80 horas. A partir del registro se establecieron los porcentajes de germinación.

#### - Curvas Dosis-Respuesta

Para seleccionar las concentraciones de NaCl y ABA para realizar los experimentos con las *AcLEA*, se realizaron curvas de dosis-respuesta con plántulas de tipo silvestre de *A. thaliana*.

#### - Evaluación de los parámetros de crecimiento y desarrollo

Los parámetros evaluados fueron: longitud de raíz primaria, longitud de la raíz lateral más larga, número y densidad de raíces laterales, diámetro del follaje, número de

hojas, biomasa total, biomasa del follaje, biomasa de la raíz. Para las mediciones se utilizaron regla, microscopio y báscula.

**- Registro fotográfico y análisis estadístico de los datos obtenidos.**

De cada experimento se registraron evidencias fotográficas, capturadas con una cámara semiprofesional y editadas con “Adobe Photoshop”. Los datos obtenidos fueron registrados en un libro de Excel, posteriormente se analizaron en el programa “Stat Soft Statistica”. Los gráficos y figuras se editaron con el programa “Adobe Illustrator”.

**- Análisis de Expresión mediante Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR)**

Se llevó a cabo la extracción del RNA de 50 plántulas por cada una de las líneas transgénicas utilizando un sistema diseñado para tales fines (Quick-RNA™ Plant Miniprep Kit/ Zymo Research). Este RNA se utilizó para sintetizar el cDNA, que se utilizó como templado para las reacciones de RT-PCR. Los productos de amplificación se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

## **VI. Impacto de las actividades**

Las actividades descritas se desarrollaron durante un periodo de 6 meses, entre febrero y agosto del presente año. El conjunto de estas actividades permitió al egresado adquirir conocimiento y capacidades para desempeñarse en un laboratorio de biología molecular de plantas. Simultáneamente, a través de la participación en seminarios y discusión de artículos mejoró sus habilidades para desenvolverse en un ámbito de investigación científica. Adicionalmente, los experimentos realizados generaron datos que no brindaron los resultados esperados, pero al mismo tiempo son relevantes para las líneas de investigación del laboratorio. La principal conclusión de los experimentos realizados fue que las líneas transgénicas de AcLEA no tienen respuestas diferentes a las plántulas de tipo silvestre en diferentes condiciones de NaCl y ABA, sin embargo, se generaron

perspectivas para que se investiguen los niveles de expresión de la proteína AcLEA que tienen estas líneas transgénicas, para poder avanzar en la explicación de la razón de los resultados obtenidos.

## **VII. Aprendizaje y habilidades obtenidas**

Las actividades relacionadas con la profesión para la liberación del servicio social se llevaron a cabo en un laboratorio de Biología molecular, realizando actividades experimentales, que resultan indispensables en la formación de los biólogos, permitiendo el desarrollo de habilidades para trabajar con materiales y equipos. Además, se refuerzan los aspectos relacionados con el método científico, análisis de datos e información, desarrollo del pensamiento crítico y objetivo sobre ciertas situaciones que generan una mayor confianza y permiten un mejor desempeño en un ambiente científico.

El trabajo en un laboratorio permite cuestionar los conocimientos adquiridos a lo largo de la Licenciatura en Biología y confrontarlos con la realidad, poniendo en práctica lo aprendido y al mismo tiempo adquiriendo nuevos conocimientos.

A lo largo de estos seis meses, realicé diversas actividades como la preparación de medios de cultivos en condiciones control y experimentales para el crecimiento de la planta modelo *A. thaliana*, desinfección de semillas para su siembra y transferencia de plántulas en condiciones asépticas, adquiriendo habilidades para seleccionar individuos con características similares; análisis del crecimiento y desarrollo de las plántulas, extracción de RNA, realización de electroforesis. Se trabajó con distintos materiales de laboratorio: micropipetas, placas Petri, mortero, tubos eppendorf, etc., así como con diferentes equipos como: autoclave, ThermoMixer, microscopio, termociclador de punto final, balanza, Vortex. Además, se manejaron reactivos químicos como el ABA, NaCl, L-MSO, agarosa, bromuro de etidio. De igual forma, aprendí a trabajar en condiciones asépticas, para evitar la contaminación en los experimentos realizados.

## VIII. Fundamento de las actividades desarrolladas

Las líneas transgénicas *AcLEA P2, P3, P4, P5, P6, P7* crecieron en medio suplementado con L-MSO. Con este experimento se corroboró que, si se estaba trabajando con líneas transgénicas, ya que todas presentaron resistencia a un análogo del herbicida fosfoinotricina que se usó como marcador de selección (Fig. 4).

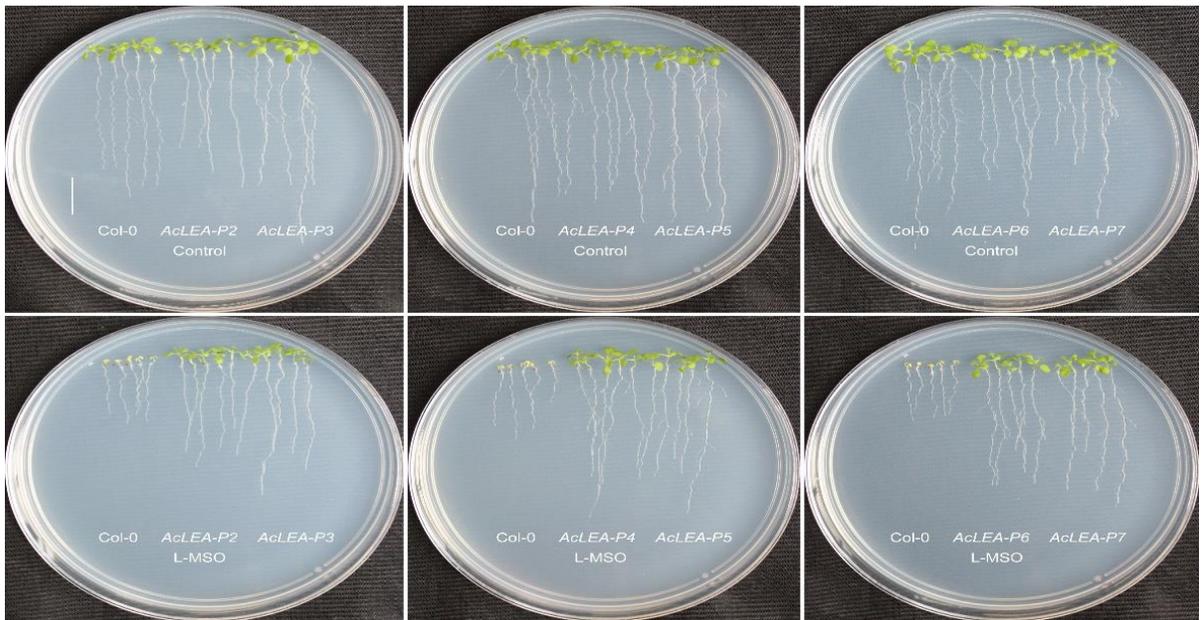


Figura 4. Respuesta de las líneas transgénicas al L-MSO.

Los porcentajes de germinación de las semillas de 5 de las líneas *AcLEA* alcanzaron el 100% después de 56 horas transcurridas. Notablemente son más precoces que la tipo silvestre (Col-0), que necesito de 80 horas para alcanzar el 100% de germinación. La excepción fue la línea *AcLEA-P2* cuya velocidad de germinación es similar a las de tipo silvestre (Fig. 5).

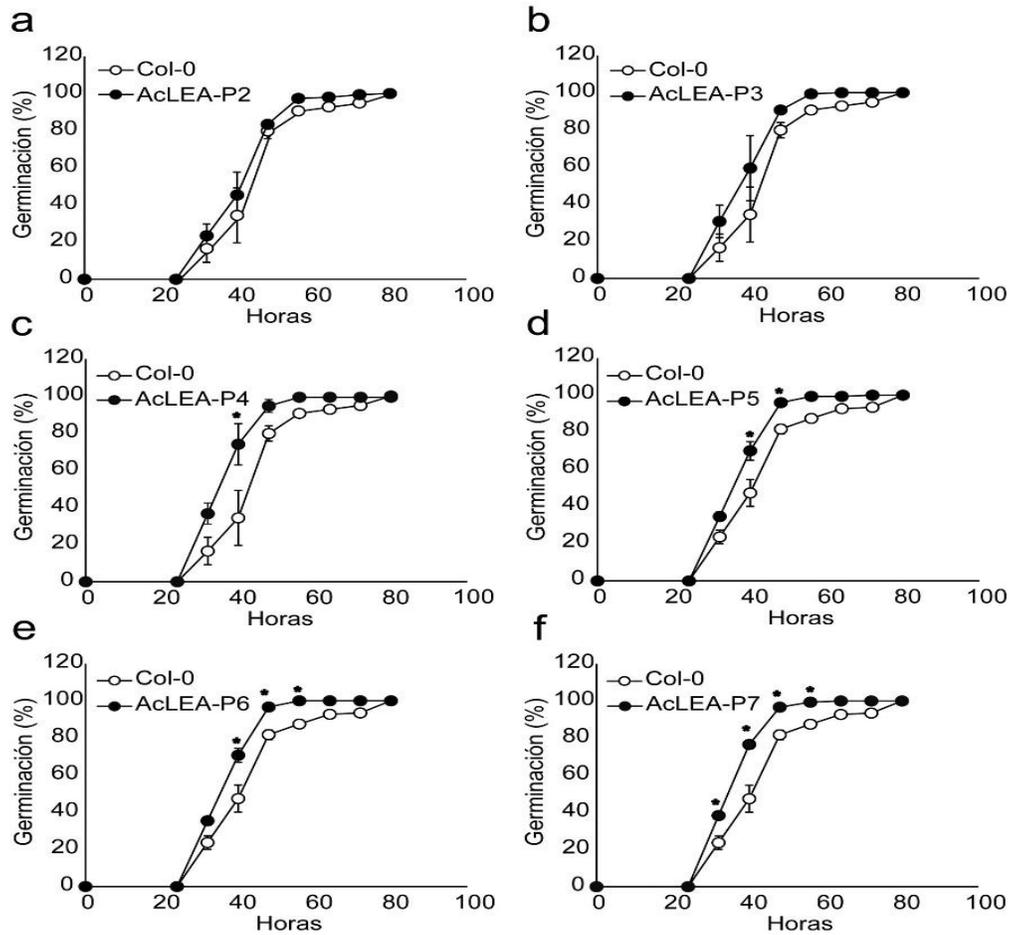


Figura 5. Porcentajes y velocidad de germinación de semillas de líneas transgénicas (*AcLEA*) y Col-0. (\*: diferencias significativas).

El análisis morfológico de las plántulas *AcLEA* crecidas en medio control mostró resultados similares a los de las plántulas de tipo silvestre y lo mismo ocurre con la acumulación de biomasa (Fig. 6 y 7). Si bien se pueden observar algunas diferencias en algunas líneas, estas no son constantes a lo largo de los experimentos, por lo que no se consideraron relevantes. En conclusión, en condiciones normales las plántulas de las líneas transgénicas son similares en su morfología a las de tipo silvestre.

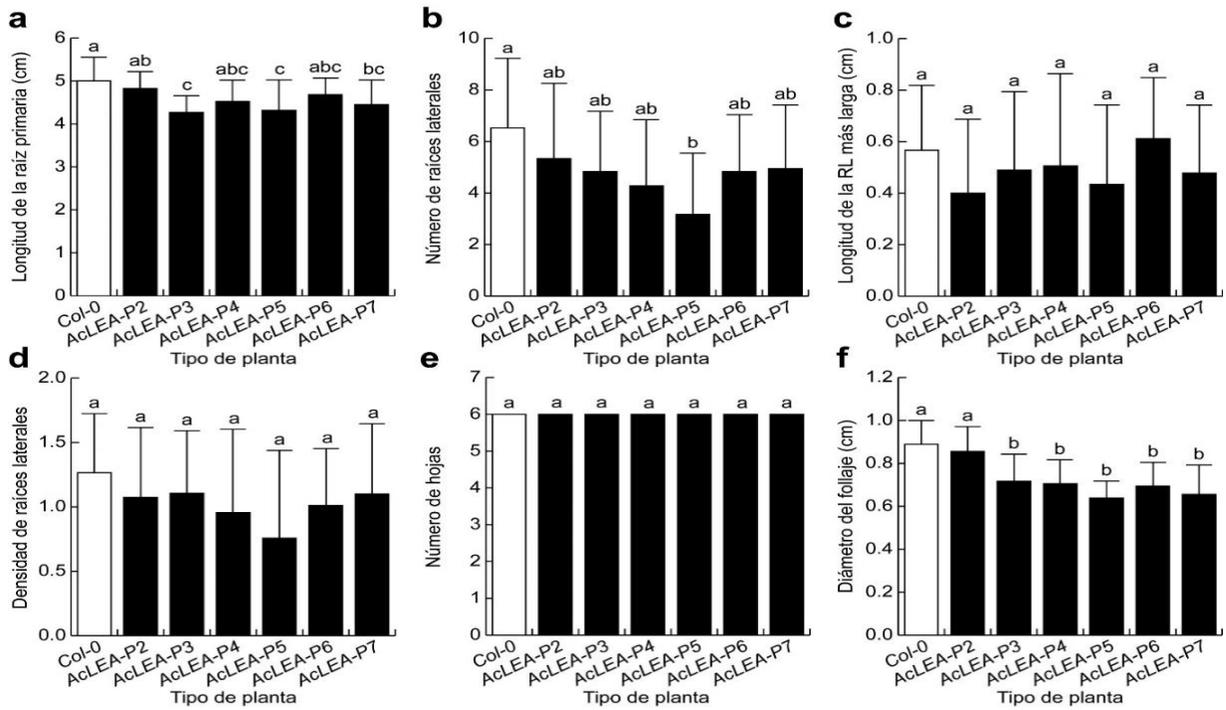


Figura 6. Morfología de plántulas *AcLEA* y tipo silvestre (Col-0) en medio MS0.2x.

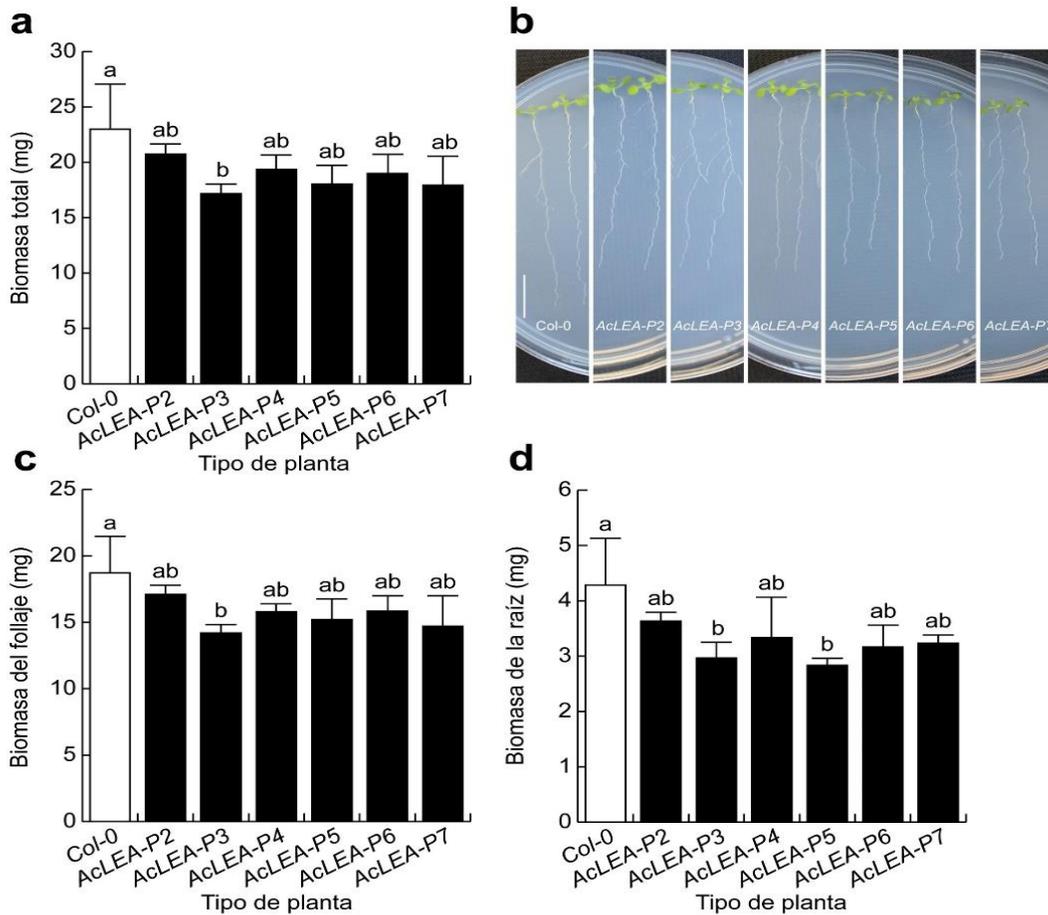


Figura 7. Biomasa de plántulas *AcLEA* y tipo silvestre (Col-0) en medio MS 0.2x

Antes de someter las líneas transgénicas al tratamiento con NaCl, se realizaron tres curvas de dosis-respuesta con plántulas de tipo silvestre. Para la primera curva se utilizaron concentraciones 0, 1, 10, 100 y 500 mM, comenzándose a ver un efecto de la sal sobre el crecimiento de las plántulas a partir de 100 mM. En 500 mM las plántulas mostraron pérdida total de la clorofila, indicando que esta concentración es muy alta y tiene efectos deletéreos (Fig. 8). Con base en los de esta primera curva se decidió realizar otra utilizando concentraciones de 0, 50, 100, 200 y 400 mM de NaCl.

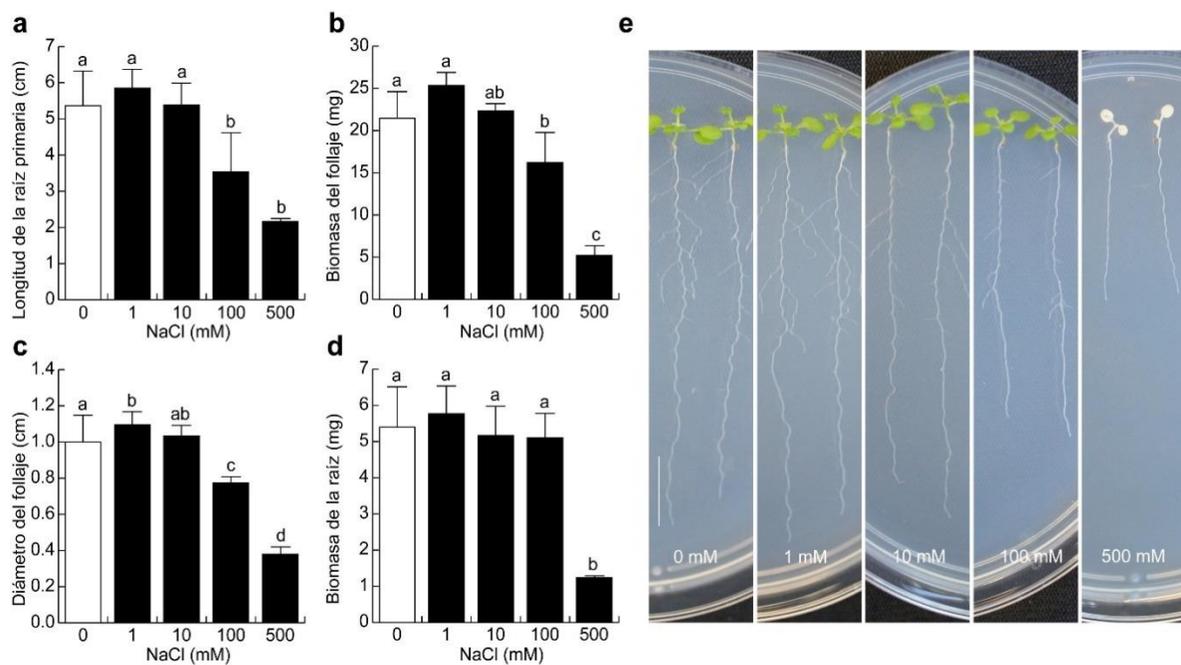


Figura 8. Respuesta de Col-0 a concentraciones de NaCl entre 1 y 500mM.

Nuevamente, a partir de 100 mM se observaron efectos de NaCl, resultando las concentraciones de 200 y 400 mM demasiado altas como para ser utilizadas en los experimentos subsiguientes (Fig. 9).

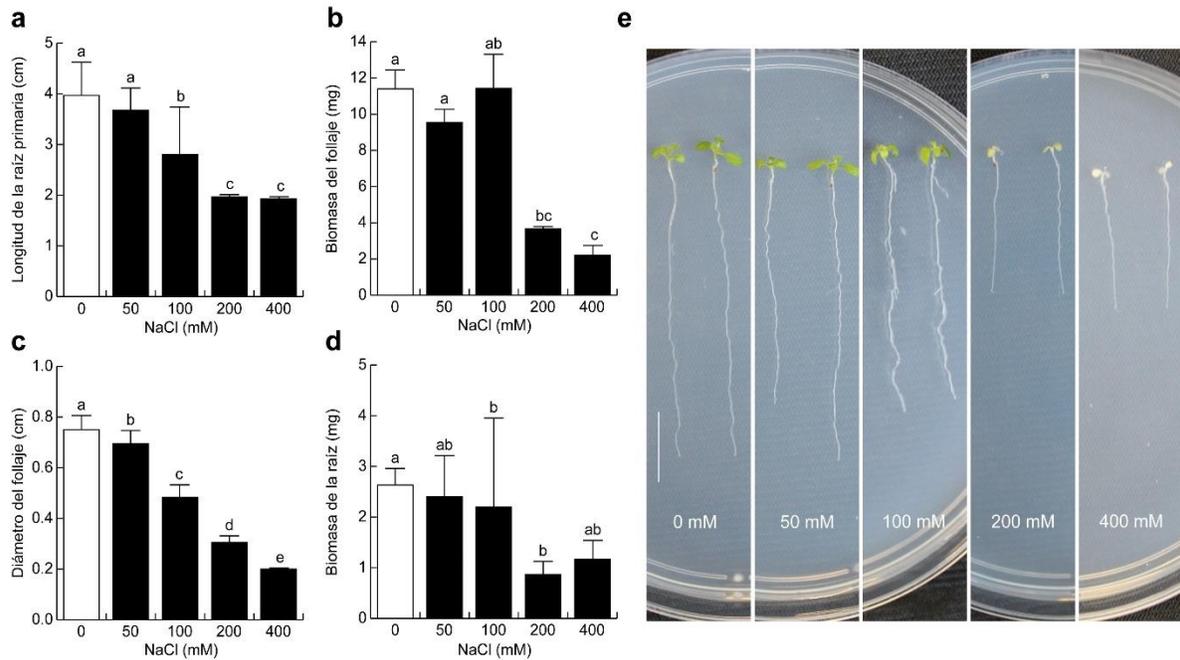


Figura 9. Respuesta de Col-0 a concentraciones de NaCl entre 50 y 400mM.

La última curva dosis-respuesta para NaCl fue con concentraciones de 0, 50 100 y 200 mM (Fig. 10). Con base en los resultados de esta curva se decidió que la concentración que sería utilizada para evaluar los efectos de la sal sobre las líneas *AcLEA* sería la de 150 mM de NaCl, que representa el punto medio entre las concentraciones de 100 mM y 200 mM que causan los mayores efectos.

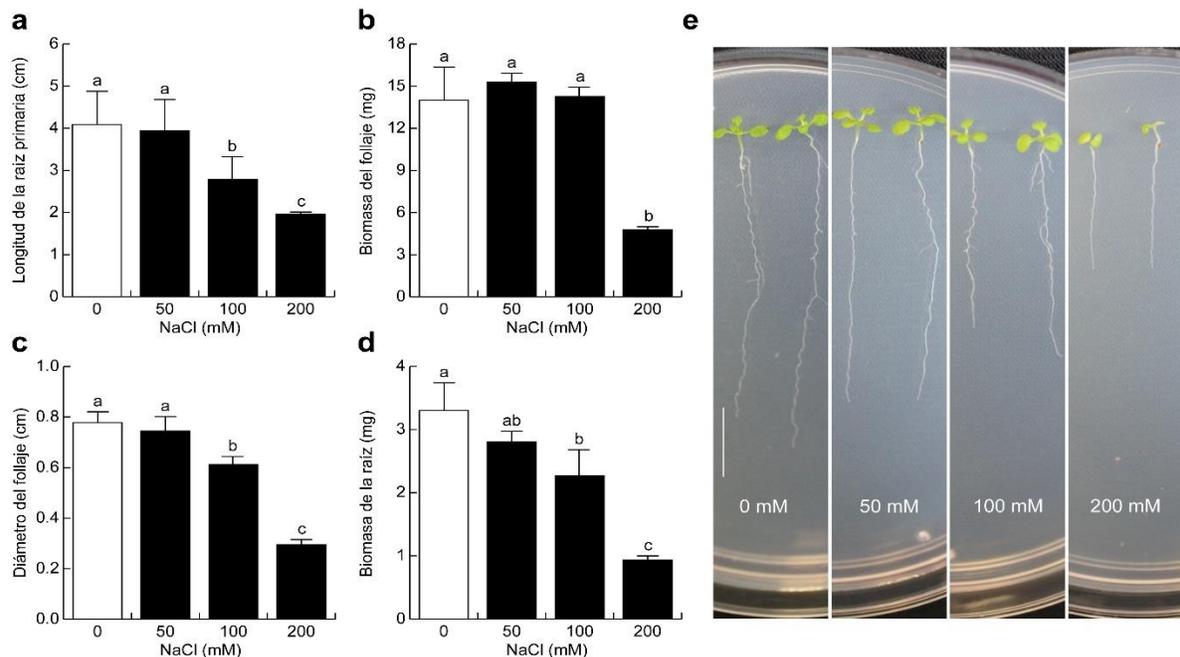


Figura 10. Respuesta de Col-0 a concentraciones de 0, 50, 100 y 200mM de NaCl.

Todas las líneas transgénicas se observan que el NaCl a 150 mM ocasiona una disminución en prácticamente todos los parámetros morfológicos evaluados siendo, la excepción del número de hojas sobre el que no hay ningún efecto. Sin embargo, no hay ninguna diferencia entre las plántulas de tipo silvestre y las de las líneas *AcLEA* (Fig. 11 y 12).

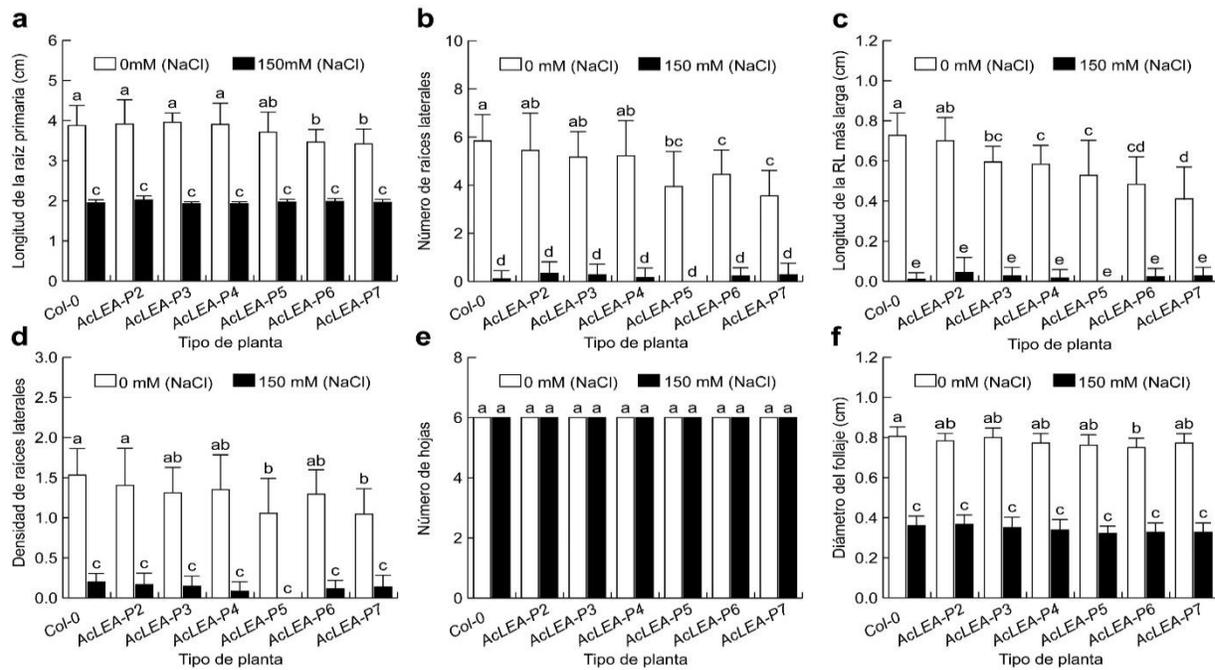


Figura 11. Efecto de una concentración 150 mM de NaCl sobre el crecimiento y desarrollo de líneas transgénicas *AcLEA*.

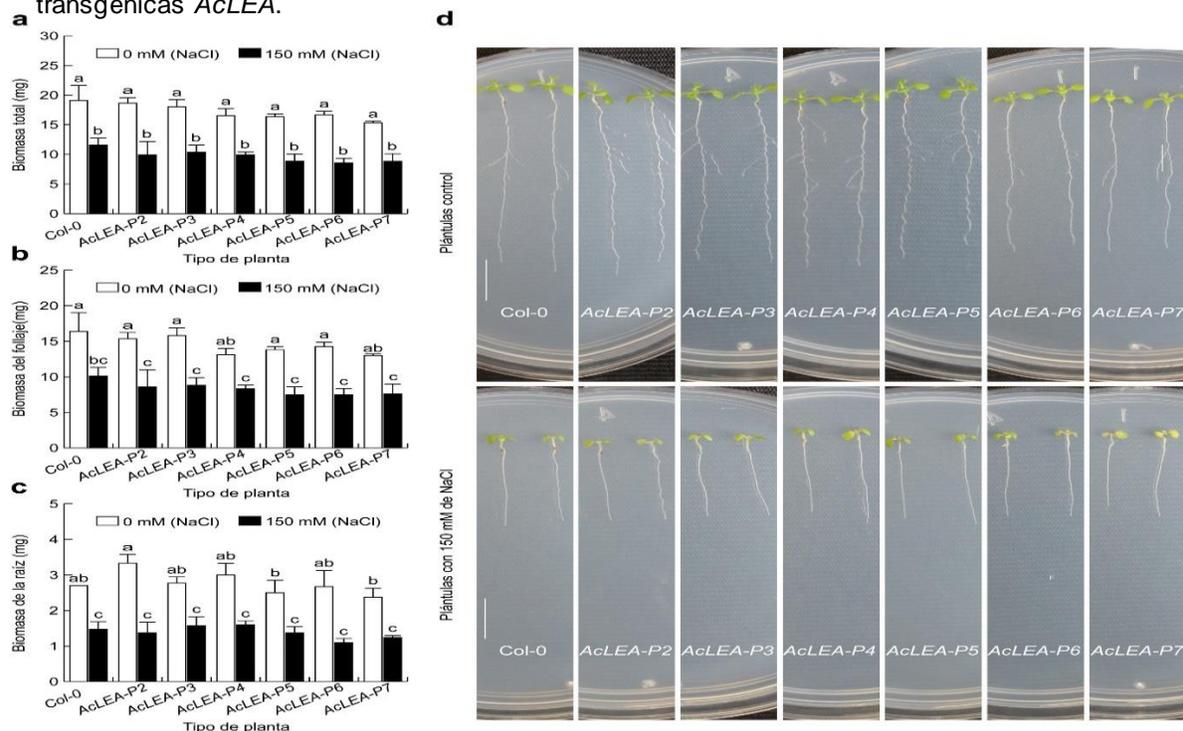


Figura 12. Efecto de una concentración 150 mM de NaCl sobre la acumulación de biomasa de líneas transgénicas *AcLEA*.

Considerando que la línea *AcLEA-P6* representa adecuadamente a las líneas transgénicas, que en general tiene un menor número y densidad de raíces laterales (Fig. 11) y son más precoces que las de tipo silvestre (Fig. 1), se decidió utilizarla para un experimento más acotado de los efectos del NaCl. En este caso, se encontró que el número de raíces laterales en *AcLEA-P6* se mantiene constante entre las concentraciones de 0mM y 75mM, mientras que en el tipo silvestre disminuye. Sin embargo, en los demás parámetros evaluados el comportamiento de la línea *AcLEA-P6* y el tipo silvestre es muy similar, concluyéndose que la proteína *AcLEA* no afecta las respuestas a salinidad en las condiciones experimentales ensayadas (Fig. 13 y 14).

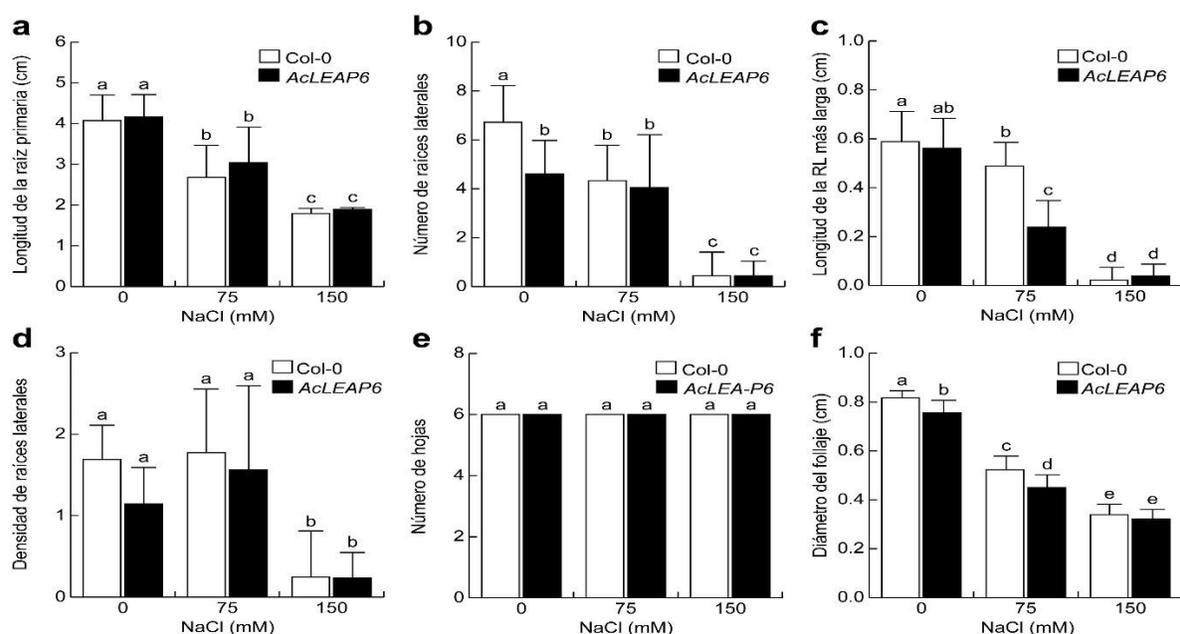


Figura 12. Respuesta de la línea *AcLEA-P6* al NaCl.

Finalmente, con base a los resultados de los experimentos anteriores, se decidió realizar uno de germinación/desarrollo exponiendo las semillas y las plántulas permanentemente a una concentración de 100 de NaCl sembrando las semillas directamente en esta condición (Fig. 14) con todas las líneas transgénicas para tener los datos de su respuesta en estas condiciones. De los resultados de este experimento se concluyó que el comportamiento de las líneas transgénicas *AcLEA* en respuesta a diferentes concentraciones de NaCl es prácticamente igual al de las de tipo silvestre.

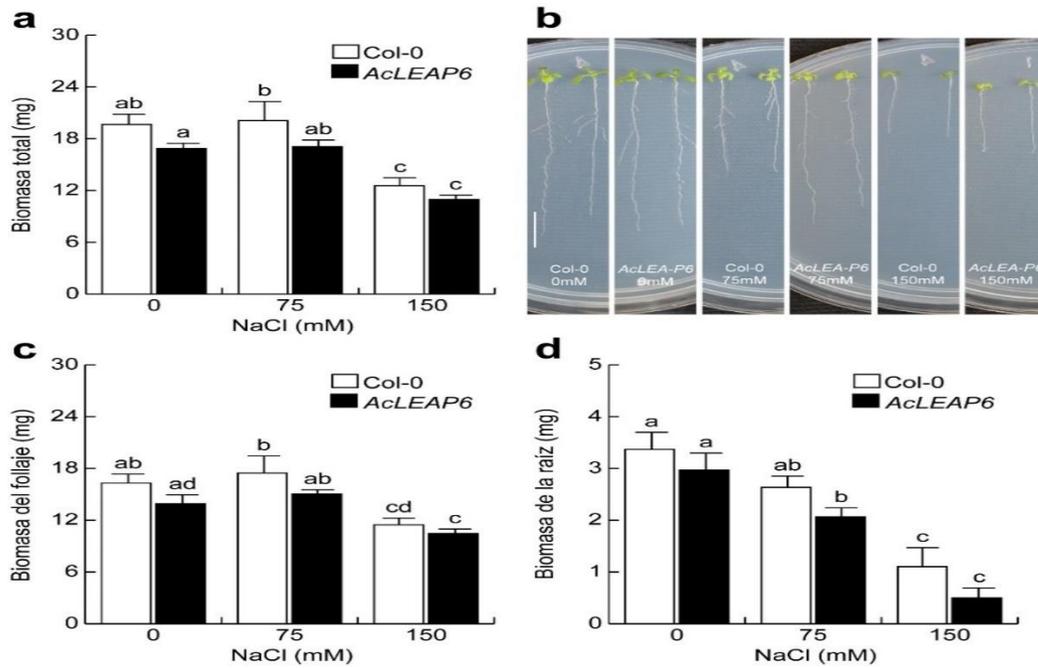


Figura 13. Acumulación de biomasa de la línea *AcLEA-P6* en NaCl.

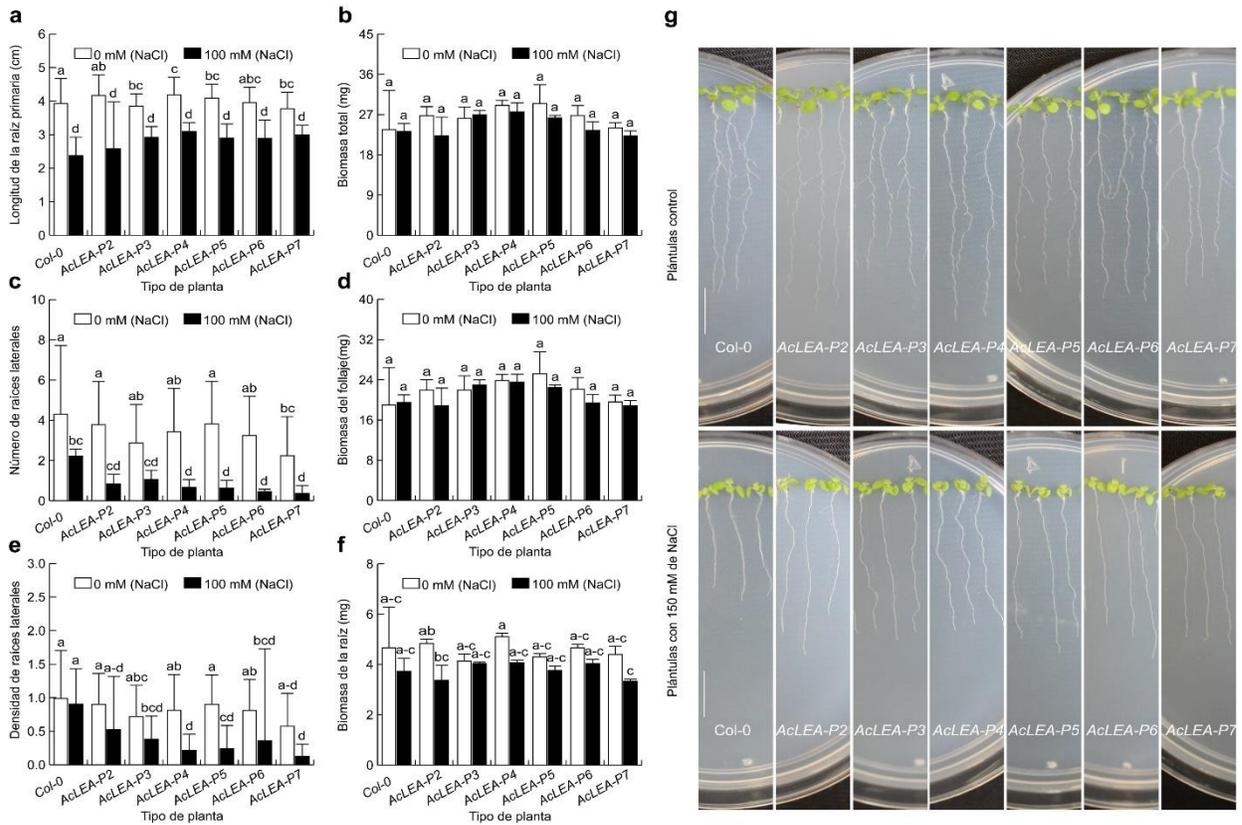


Figura 14. Respuesta de líneas transgénicas *AcLEA* por exposición permanente al NaCl

Para el caso del ABA se siguió una estrategia similar a la empleada con los experimentos con sal, es decir, se realizaron curvas de dosis-respuesta con plántulas de tipo silvestre para acotar aquella concentración de ABA más adecuada para realizar los experimentos con las líneas transgénicas. Inicialmente se probaron concentraciones de 0, 0.1, 1, 10 y 50  $\mu\text{M}$  de ABA, observándose que a 10  $\mu\text{M}$  ya es posible distinguir una respuesta en las plántulas, que consiste en una restricción del crecimiento y desarrollo (Fig. 15).

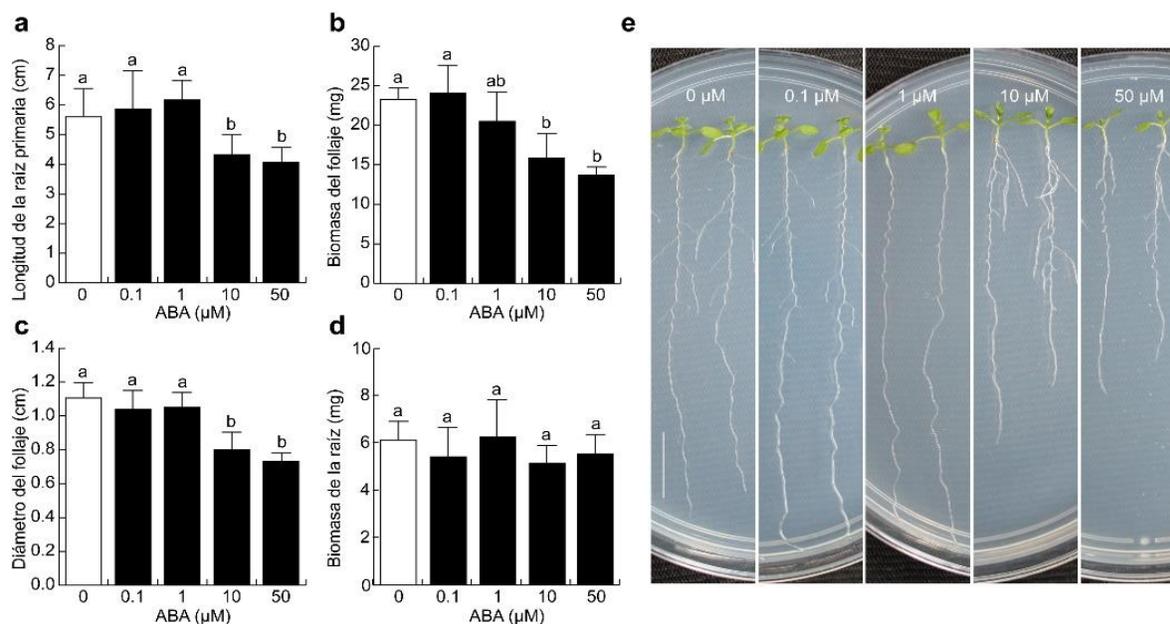


Figura 15. Respuesta de plántulas de tipo silvestre (Col-0) a diferentes concentraciones de ABA

En el siguiente experimento se optó por aumentar las concentraciones, ensayándose 0, 50, 75, 100 y 150  $\mu\text{M}$  de ABA. El resultado fue que el efecto de las concentraciones de ABA mayores a 50  $\mu\text{M}$  de ABA es prácticamente el mismo para todos los parámetros evaluados, siendo la excepción el tratamiento de 150  $\mu\text{M}$  que tuvo un fuerte impacto sobre la acumulación de biomasa de la raíz (Fig. 16). Notablemente, el tamaño de las plántulas evaluadas de este experimento, en esta curva fue menor al habitualmente observado en condiciones control (Fig. 17), por lo que debe ser tomado con reservas y resulta necesario corroborar el dato en experimentos subsecuentes.

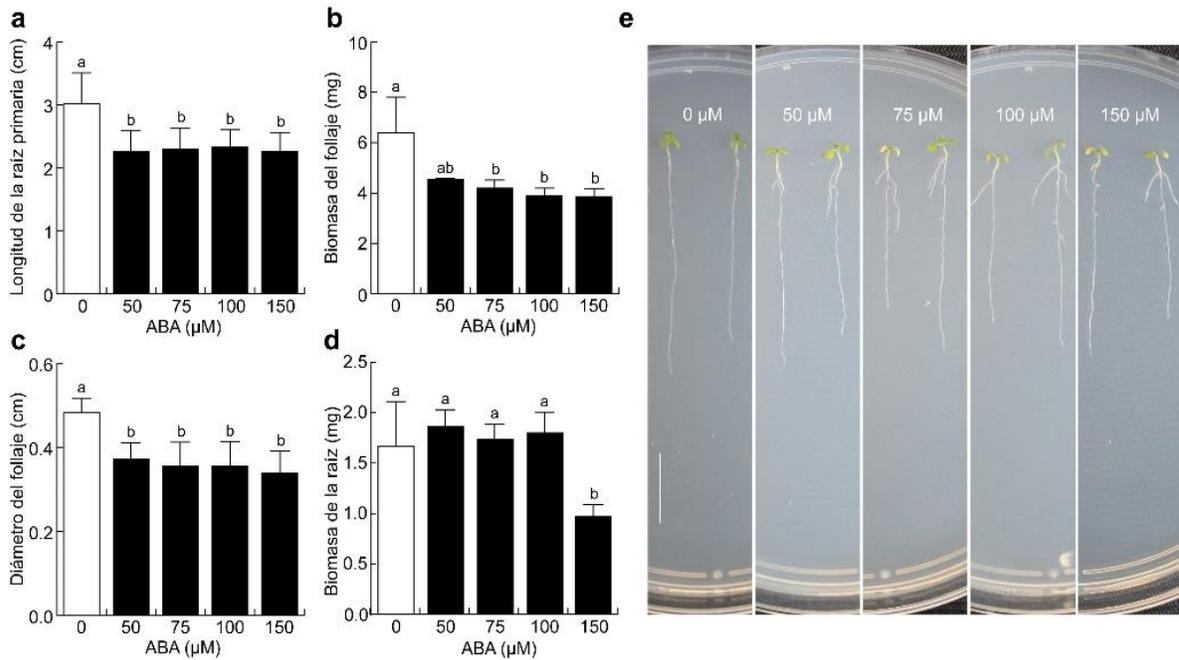


Figura 16. Respuesta de Col-0 a concentraciones de ABA superiores a 50  $\mu\text{M}$ .

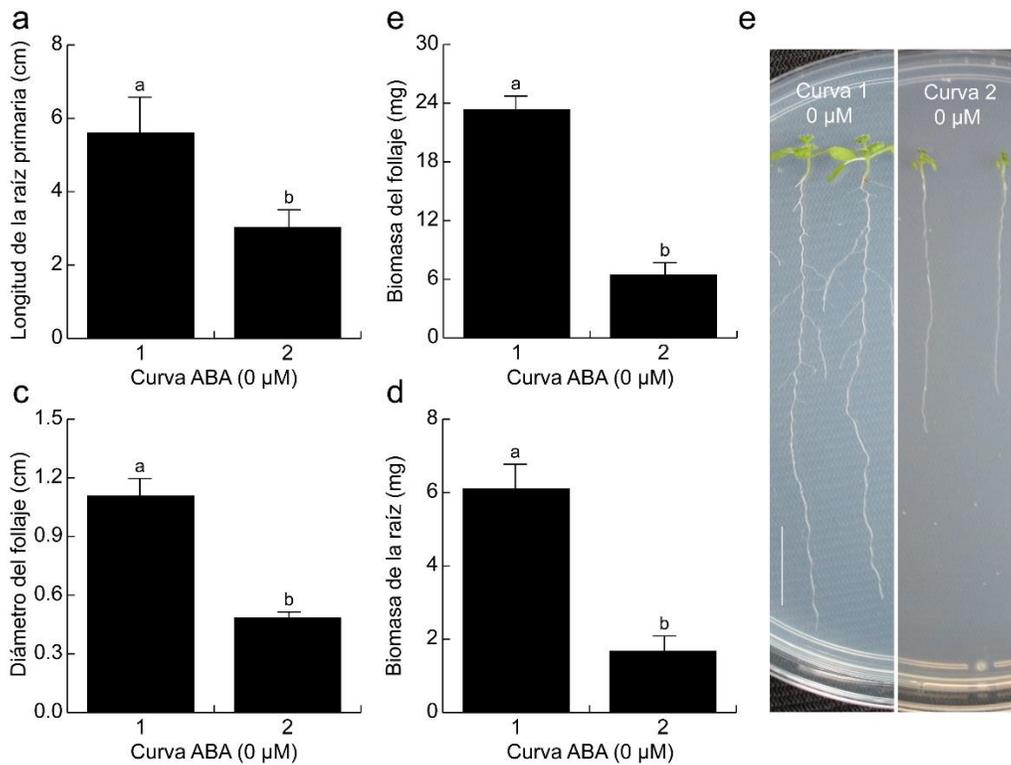


Figura 17. Comparación de las curvas 1 y 2 en condiciones control.

Para el último experimento dosis-respuesta al ABA se utilizaron concentraciones de 0,50, 100 y 200  $\mu\text{M}$ . Nuevamente se observó que los efectos de concentraciones

superiores a 50  $\mu\text{M}$  son similares a los de esta concentración (Fig. 18). De tal manera, para evaluar los efectos del ABA sobre las líneas transgénicas *AcLEA* se decidió utilizar una concentración de 50  $\mu\text{M}$  de ABA.

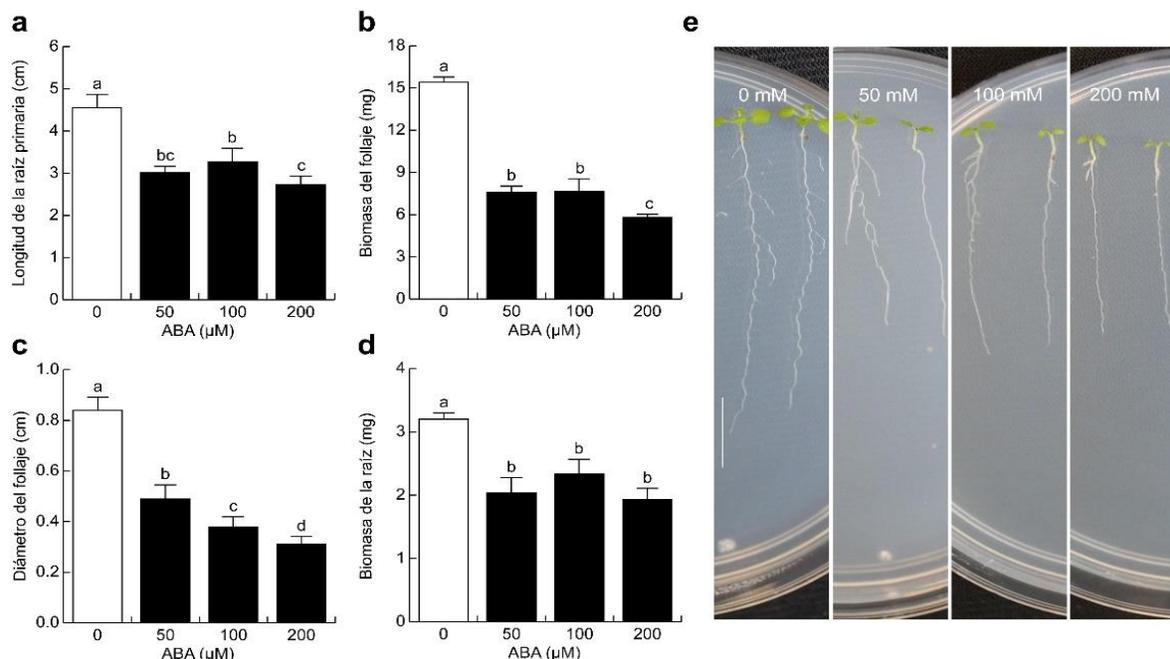


Figura 18. Respuesta de Col-0 a concentraciones de 0, 50, 100 y 200  $\mu\text{M}$  de ABA.

Así, para evaluar el efecto del ABA sobre las líneas *AcLEA*, todas fueron sembradas en medio suplementado con 50  $\mu\text{M}$  de esta fitohormona. Desafortunadamente, los resultados de estos experimentos no son confiables, ya que la exposición al ABA, con excepción al diámetro del follaje, no tuvo el efecto negativo sobre el crecimiento y desarrollo de las plantas tipo silvestre (control), como era de esperarse (Fig. 19 y 20). Para sacar conclusiones a este respecto será necesario repetir estos experimentos.

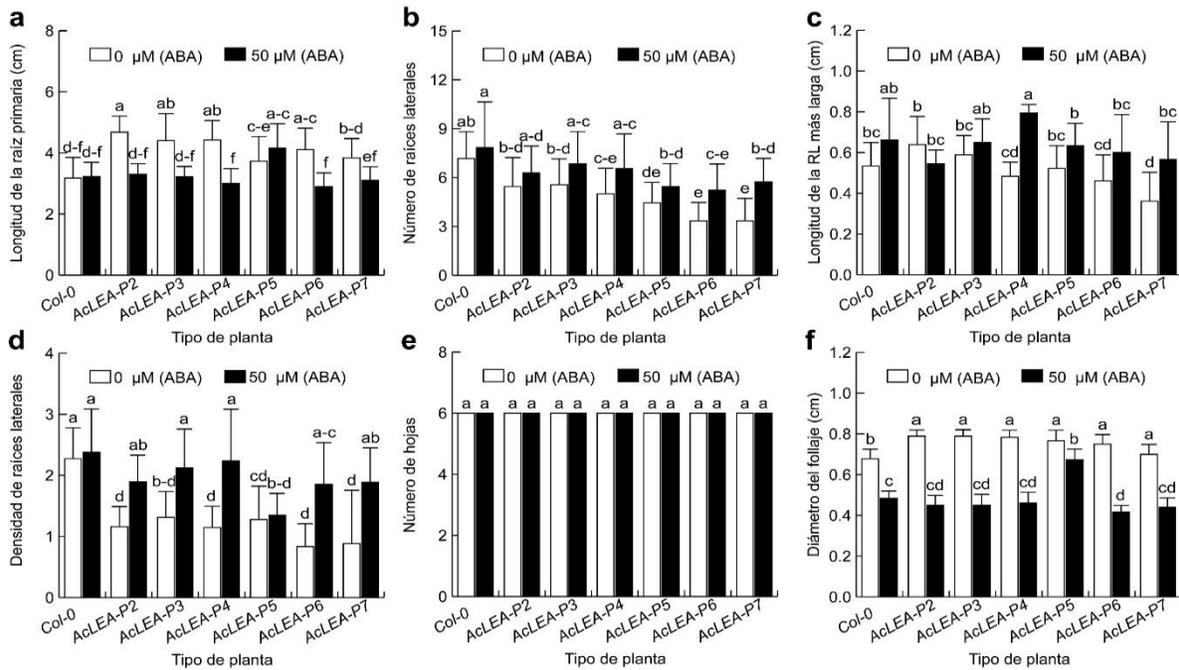


Figura 19. Respuesta de las líneas transgénicas a 50 μM de ABA.

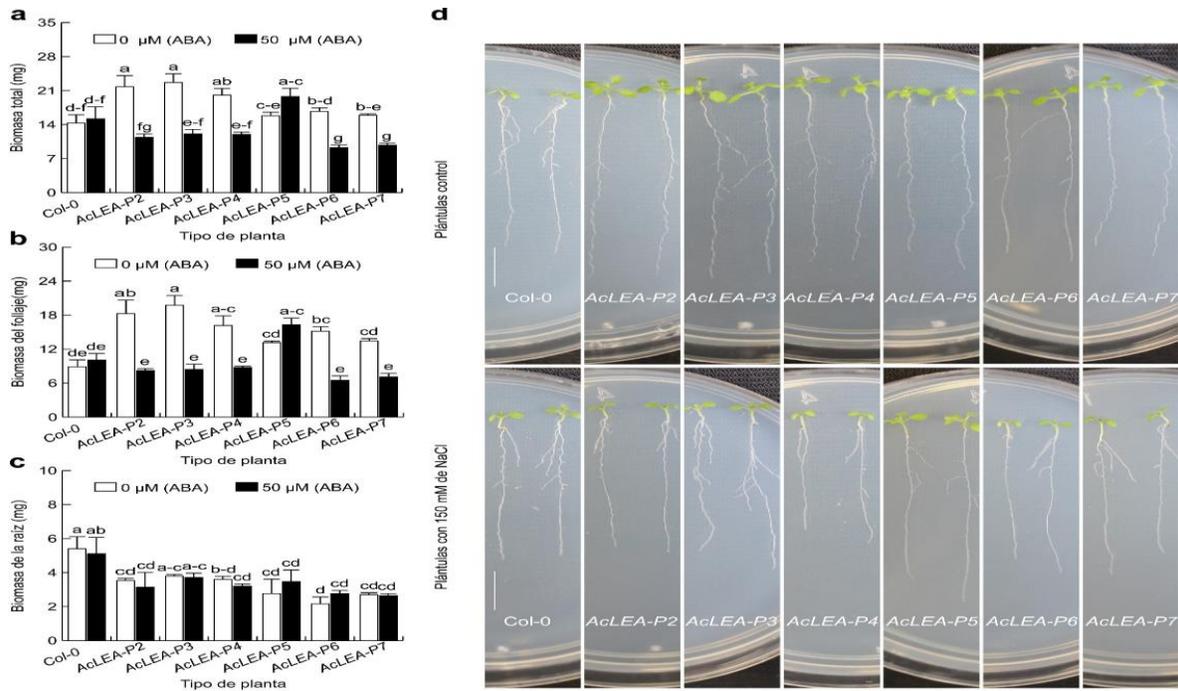


Figura 20. Efectos sobre la acumulación biomasa de líneas transgénicas de 50 μM de ABA.

De cualquier manera, como previamente se hizo con la respuesta a NaCl, los experimentos con ABA también se restringieron a la línea *AcLEA-P6*. Sin embargo, nuevamente no hubo diferencias significativas en las respuestas al ABA entre las líneas *AcLEA-P6* y el tipo silvestre (Fig. 21 y 22), aunque en este caso, tampoco son del todo claros los efectos negativos esperados para los tratamientos con ABA,

llegando incluso a observarse incrementos en la densidad de las raíces laterales (Fig. 21), lo que en conjunto hace necesario que estos experimentos tengan que ser repetidos para dar una conclusión.

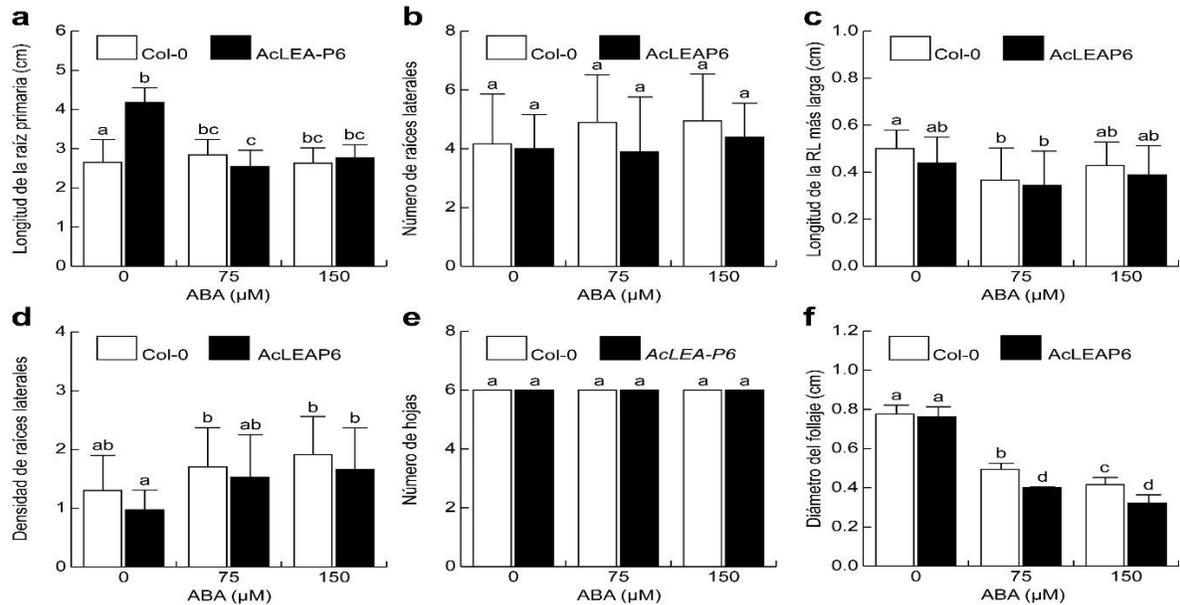


Figura 21. Respuesta de *AcLEA-P6* a ABA (0  $\mu\text{M}$ -150  $\mu\text{M}$ ).

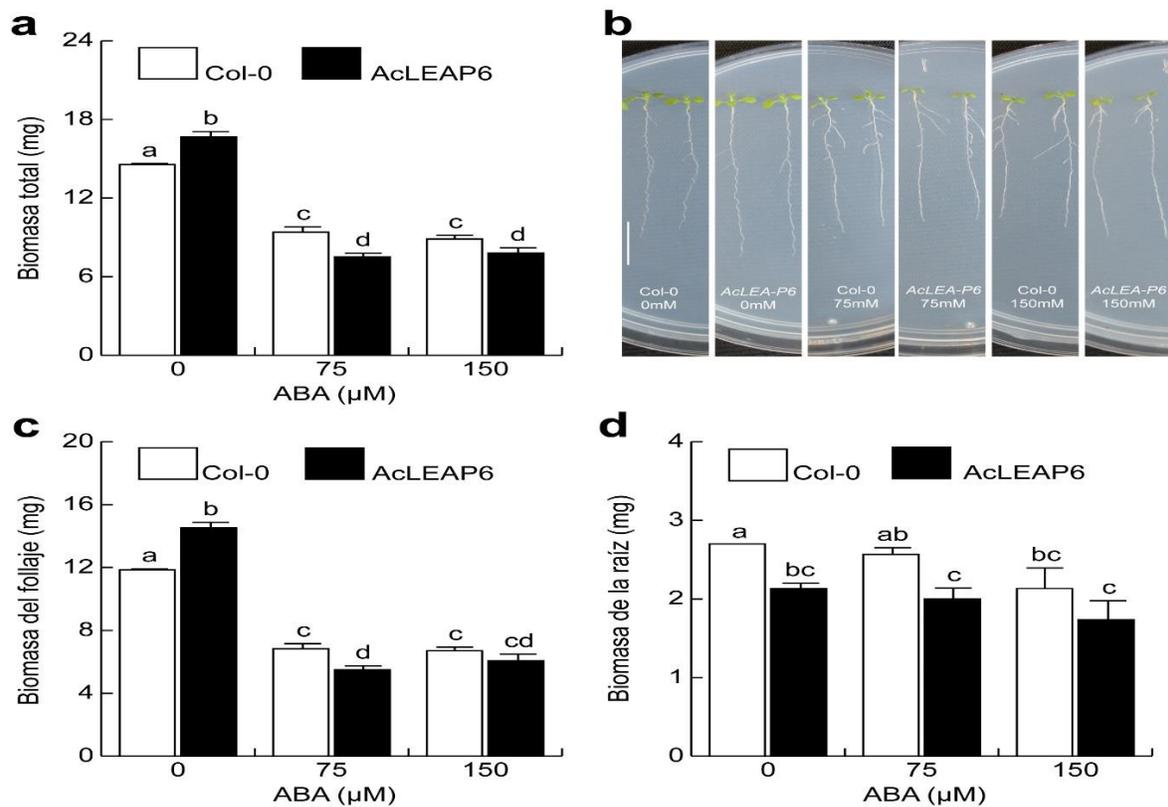


Figura 22. Biomásas de *AcLEA-P6* en diferentes concentraciones de ABA (0  $\mu\text{M}$ -150  $\mu\text{M}$ ).

Finalmente, se evaluaron las respuestas de las líneas transgénicas *AcLEA* a la exposición permanente al ABA, mediante la siembra de semillas y el crecimiento de las plántulas directamente en medios suplementados con una concentración de 1  $\mu$ M de ABA, ya que en concentraciones superiores las semillas no germinan. En estas condiciones, los efectos negativos del ABA sobre el crecimiento y desarrollo son evidentes, aunque prácticamente iguales sobre las líneas transgénicas y las plantas tipo silvestre (Fig. 22).

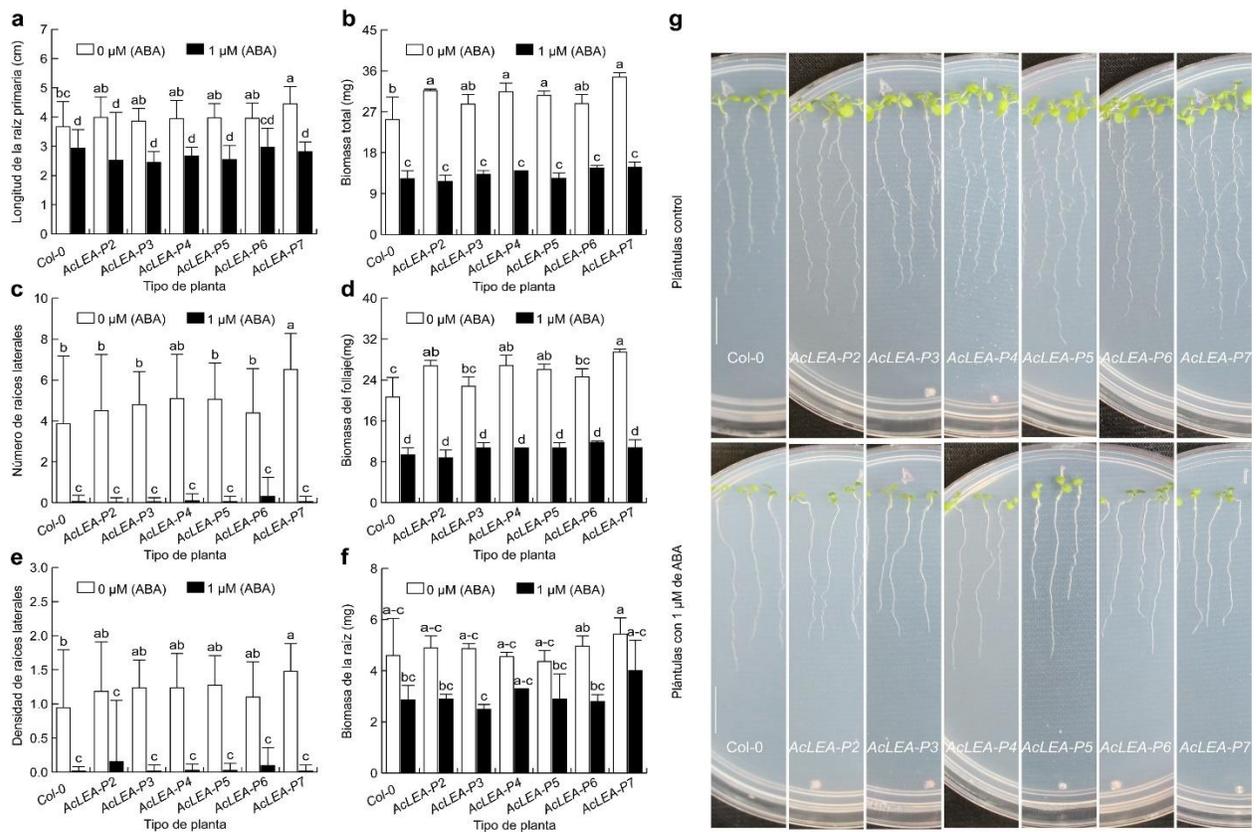


Figura 22. Respuesta de líneas transgénicas *AcLEA* a la exposición permanente a 1  $\mu$ M de ABA

Dado que existen reportes de que la expresión heteróloga de proteínas LEA ocasiona mejoras en las respuestas de las plantas al déficit hídrico (Dalal *et al.*, 2009; Olvera- Carrillo *et al.*, 2010; Saucedo *et al.*, 2017), los resultados de los experimentos aquí reportados son un tanto inesperados. De tal manera, resulta indispensable demostrar que las líneas transgénicas bajo estudio realmente están sobre-expresando la proteína *AcLEA* con la que fueron transformadas. Como primer

paso en este sentido, se procedió a realizar una extracción de RNA de las líneas transgénicas, que más adelante pueda ser utilizado para realizar un análisis de expresión de la proteína *AcLEA* mediante reacciones de retrotranscripción acopladas a reacciones de polimerización en cadena (RT-PCR) (López, 2011). Al momento, ya se realizó la purificación del RNA, la obtención del cDNA correspondiente y la amplificación de un gen de expresión constitutiva, para demostrar que el RNA obtenido es útil y con la integridad suficiente para eventualmente proceder a la amplificación del gen de interés (Fig. 23).

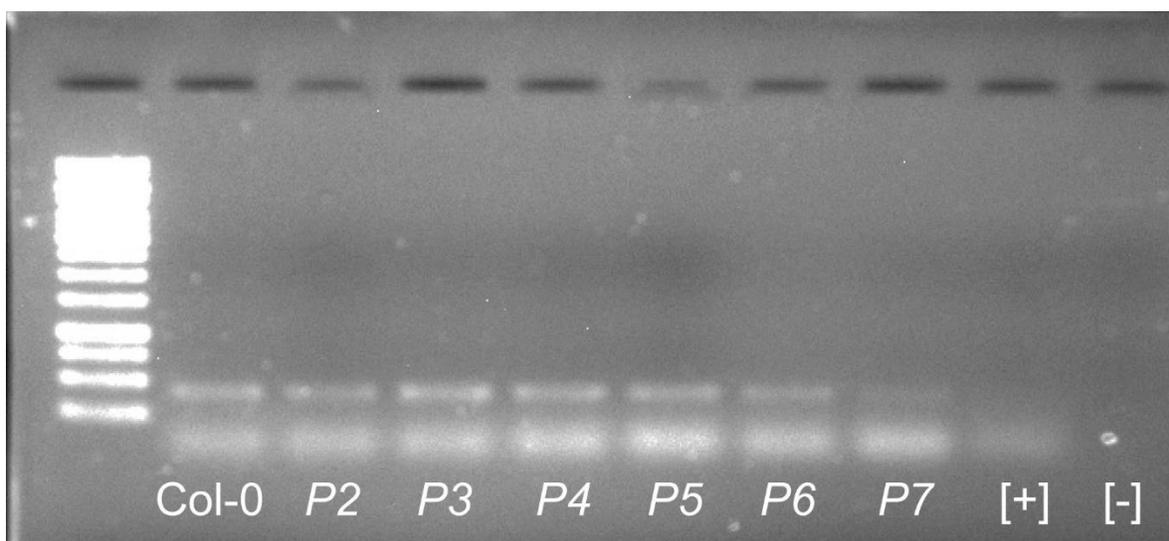


Figura 23. Amplificación del gen *UBI6* en cDNA de líneas transgénicas *AcLEA* (*P2*, *P3*, *P4*, *P5*, *P6*, *P7*) y tipo silvestre (*Col-0*) de *A. thaliana*.

[-] Amplificaciones sin mezcla de reacción (control negativo)

[+] Amplificaciones con una muestra de RNA previamente purificada y verificada (control positivo)

*UBI6*: fragmento de 413 pares de bases

## Agradecimientos

Este trabajo de Servicio Social, como requisito para la obtención del Grado de Licenciada en Biología, se realizó en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría interna de la M. en C. Aída Marisa Osuna Fernández y la externa del Dr. Ángel Arturo Guevara-García y la supervisión directa del Dr. Salvador Barrera Ortiz, gracias a los fondos aportados por el programa DGAPA-PAPIIT a través del proyecto IN209420.

## Referencias

- Battaglia M., Olvera-Carrillo Y., Garciarrubio A., Campos F. y Covarrubias A. (2008). The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. *Plant Physiology*. 148(1):6-24.
- Benavides A. (2002). *Ecofisiología y bioquímica del estrés en plantas*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. 228 p.
- Cardozo P. y Quiriban A. (2014). Las proteínas en la tolerancia al estrés hídrico en plantas. *Revista de la Facultad de Agronomía UNLPam*. Argentina. 24(1):55-67
- Chen Y., Li C., Zhang B., Yi J., Yang Y., Kong C., Lei C. y Gong M. (2019). The Role of the Late Embryogenesis-Abundant (LEA) Protein Family in Development and the Abiotic Stress Response: A Comprehensive Expression Analysis of Potato (*Solanum Tuberosum*). *Genes*. 10(148):1-16.
- Covarrubias-Robles A. A. (2007) Sobrevivir al estrés: cómo responden las plantas a la falta de agua. *Biotecnología*. 14: 253-262.
- Cuevas-Velázquez C. L. y Covarrubias-Robles A. A. (2018) Intrinsically unstructured proteins and their function: a new view of protein structure and plant responses to stress. *Revista especializada en ciencias químico-biológicas*. 14(2): 97-105.
- Cuming, A. C. (1999) LEA proteins. In *seed Proteins*. Kluwer Academic Publishers. 753-780 p.
- Dalal M., Tayal D., Chinnusamy V. y Bansal K. C. (2009). Abiotic stress and ABA-inducible Group 4 LEA from *Brassica napus* plays a key role in salt and drought tolerance. *J. Biotechnol.* 137–145.
- Dure L. III (1989). Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 12:475–486.
- Earley K. W., Haag JR, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard CS. 2006. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J.* 45(4):616-629.
- Flórez V. y Aleixo M. (2009) Abscisic acid speed up floral development of solidago under short days. *Rev. Fac. Nal. Agr.* 62(1):4835-4841.

- Ju H., Li D., Li D., Yang X. y Liu Y. (2021). Overexpression of ZmDHN11 could enhance transgenic yeast and tobacco tolerance to osmotic stress. *Plant Cell Rep.* 40(9):1723-1733.
- Lindsey B., Rivero L., Calhoun C., Grotewold E. y Brkljacic J. (2017). Método estandarizado de esterilización de alto rendimiento de *Arabidopsis*. *JoVE Journal Biology*.
- López C. E. (2011). *Fundamentos y técnicas básicas en biología molecular*. Universidad Nacional de Colombia.
- Maldonado E. C. (2014). Análisis proteínico del grano de amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* y *A. cruentus*) y obtención del mapa proteómico de *Amaranthus cruentus*. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C. 70 p.
- Mertens J., Aliyu H., Cowan D. A. (2018). LEA Proteins and the Evolution of the WHY Domain. *Applied and Environmental Microbiology*. 84(15):1-8.
- Moreno L. P. (2009). Respuestas de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agronomía Colombiana*. 27(2): 179-191.
- Murashige T. y Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497
- Olvera-Carrillo Y., Campos F., Reyes JL, Garcarrubio A., Covarrubias AA (2010). El análisis funcional de las proteínas abundantes en embriogénesis tardía del Grupo 4 revela su relevancia en la respuesta adaptativa durante el déficit hídrico en *Arabidopsis*. *Fisiología vegetal*. 373–390.
- Pirola, M. J. (2018). Estudio del efecto de la salinidad en la germinación y floración de *Arabidopsis thaliana*. Universidad Argentina de la empresa. 85 p.
- Saucedo A. L., Hernández-Domínguez E. E., de Luna-Valdez L. A., Guevara-García A. A., Escobedo-Moratilla A., Bojorquéz-Velázquez E., del Río-Portilla F., Fernández-Velasco D. A. y Barba de la Rosa A. P. (2017). Insights on Structure and Function of a Late Embryogenesis Abundant Protein from *Amaranthus cruentus*: An Intrinsically Disordered Protein Involved in Protection against Desiccation, Oxidant Conditions, and Osmotic Stress. *Frontiers in Plant Science*. 8: 1-15.

Thompson C. J., Movva N. R., Tizard R., Cramer R., Davies J. E., Lauwereys M., Botterman J. (1987). Characterization of the herbicide-resistance gene bar from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.*, 6(9):2519-2523.