



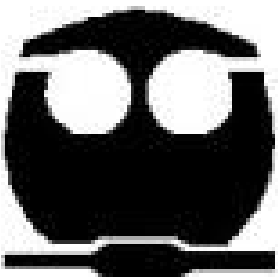
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

FACULTAD DE QUÍMICA

**EFECTO DEL ESTRÉS ABIÓTICO SOBRE  
LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LA  
OXIDASA ALTERNA EN *Zea mays* Y EN  
PLANTAS TRANSFORMADAS DE  
*Nicotiana tabacum***

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA DE ALIMENTOS  
P R E S E N T A:  
ALAIDE PÉREZ OROZCO



MÉXICO, D. F.

2006



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

---

**JURADO ASIGNADO:**

**Presidente**            M. en C. RAUL GENARO AGUILAR CABALLERO

**Vocal**                Dra. IRMA OFELIA BERNAL LUGO

**Secretario**           M. en C. ELPIDIO GARCIA RAMIREZ

**1er Suplente**        Dr. FRANCISCO RUIZ TERAN

**2do Suplente**        M. en C. SELENE FRAGOSO IÑIGUEZ

**Sitio donde se desarrolló el proyecto:** Laboratorio 104. Departamento de Bioquímica, Conjunto E. Facultad de Química, UNAM

**Nombre completo y firma del asesor del tema**

**Dra. IRMA OFELIA BERNAL LUGO**

**Nombre completo y firma del supervisor técnico**

**M. en C. VANESSA MAYA AMPUDIA**

**Nombre completo y firma del sustentante**

**ALAIDE PEREZ OROZCO**

# AGRADECIMIENTOS

---

---

*Gracias...*

*Dios Padre por que estas siempre a mi lado y jamás me abandonarás. Gracias a tu presencia he hecho realidad uno de mis grandes sueños. No tengo las palabras para agradecerte tanta dicha.*

*A mi mamá Luz María y mi papá Eduardo por sus esfuerzos constantes para nosotros sus hijos, por su dedicación, su comprensión y sobre todo por su inmenso amor. Todos mis éxitos son especialmente dedicados a ustedes, los amo.*

*A mi hermanito Lalo por que de ti he aprendido a soñar, a tener paciencia, por tu inocencia, por tu lucha incansable. Los sueños se cumplen y deseo con toda el alma que un día cumplamos tu sueño.*

*A mi hermanita Violeta mi inseparable amiga del alma, por compartir conmigo la vida, por enseñarme a ser persistente, a tener tranquilidad, y sobre todo por el amor que compartimos.*

*A mi Abuelita Adela por ser la mujer que eres, por llenarme de alegría, por tener esa gran personalidad, por estar siempre al pendiente de cada uno de nosotros, por enseñarme a disfrutar la vida, por todo lo que hemos compartido, te amo abue.*

*A Raúl por tenerme tanta paciencia, por tu comprensión, por acompañarme en este trayecto y sobre todo por tu amor incondicional que me hace sentir completa. Te admiro por las innumerables virtudes que te caracterizan, eres el amor de mi vida.*

*A mi tía Sandra, por la humildad que reina en tu corazón, por tu profesionalismo, por la ecuanimidad de tu ser y por el apoyo incondicional que me brindas.*

*A mi tía Sonia, por tu sensibilidad que me identifica, por tu alma de guerrera, por la lucha que libras todos los días y sobre todo por tu ejemplo para salir adelante en las adversidades.*

*En memoria de mi tía **Edith** por alentarnos, por creer en nosotros, por que se que donde estas, a un costado de Dios, me acompañas con tus bendiciones. Te extraño mucho.*

*A mis primas **Ale** y **Luz A.** por la hermandad que nos unen, por los consejos y vivencias, por el tiempo que me dedican, por estar siempre al pendiente de mi, por la mano siempre extendida dispuesta a ayudarme cuando las necesite, por su ejemplo, las quiero muchísimo.*

*En memoria de mi tío **Abel** por tu sencillez, por tu dedicación y por tu preocupación hacia las demás personas. Siempre te recordare.*

*A todos mis familiares que viven lejos, a mis tíos paternos (Tere, Fina, Beto, Pancho, Ofelio, Toña, Fausta), a mis tíos maternos (Inés Vicente, Juan, Chu, Cui, Oswaldo) y amigos parte de la familia (Chelita, Paco, Estela, Arturo y mi madrina Lety).*

*A mis amigos **Ricardo**, **Israel** y **Edith** piezas fundamentales en mi carrera por que gracias a su amistad equilibre la responsabilidad que se requiere para salir adelante. A mi amiga **Carito** confidente de mis aventuras, por tu amistad, por tu sinceridad, por levantarme el ánimo. Muchísimas gracias amigos.*

*A la **Dra. Irma O. Bernal Lugo** por acogerme en su laboratorio, por su inmensa comprensión, por su preocupación que va más allá de lo laboral y sobre todo por ese gran ser humano que lleva dentro. Aprendí muchas cosas a su lado.*

*A mi asesora técnica **M. C. Vanesa Maya Ampudia** por tu enorme corazón, por tu tiempo que dedicaste para realizar este proyecto, por tu sentido del humor, de ti aprendí la dedicación que se requiere para este trabajo y muchísimas gracias por alentarme; te robaste mi admiración.*

*A todos mis **compañeros del laboratorio 104** siempre dispuestos a ayudarme en todo lo que se pudiese especialmente a **Adriana** por compartir tantos momentos agradables y por todo tu trabajo que complemento el mío, a **Valeria** y **Goyo** por su seguridad, sus*

*oportunos consejos, por su compañerismo, por su amistad y por el sin fin de veces que me asesoraron, a **Edson** por tu amistad y por acompañarme en esta trayectoria llamada tesis.*

*A la **Q. Laurel F. I.** por las facilidades otorgadas en el equipo para realizar este proyecto y por compartir momentos agradables.*

*A la **UNAM** por terminar de formarme y por que forma un capítulo muy importante de mi vida..*

# CONTENIDO

---

---

	<b>Página</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	
<i><b>Especies Reactivas de Oxígeno</b></i>	<b>2</b>
¿Qué es un radical?	
Características reactivas de los radicales	
El oxígeno como radical	
<i><b>Producción de EROs en la célula</b></i>	<b>4</b>
Estructura mitocondrial	
Cadena mitocondrial transportadora de electrones	
Oxidasa Alterna	
<i><b>Mecanismos de defensa contra EROs</b></i>	<b>10</b>
Estrés oxidativo en células	
Estrés Abiótico	
<b>ANTECEDENTES INMEDIATOS</b>	<b>15</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>16</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
Objetivo general	
Objetivos particulares	
<b>METODOLOGÍA</b>	
<b>Material biológico</b>	<b>18</b>
<b>Métodos</b>	
<i><b>Obtención de la sonda específica para la AOx</b></i>	<b>19</b>
Clonación del inserto	
Purificación del plásmido	
Digestión del plásmido para liberar el inserto	
Purificación del inserto	
Marcado radiactivo del inserto	

---

Purificación de sonda	
Cuantificación de la actividad específica de la sonda	
<b><i>Obtención de ácidos nucleicos</i></b>	<b>22</b>
Aislamiento de RNA total	
Aislamiento de DNA	
<b><i>Hibridación tipo Northern Blotting</i></b>	<b>24</b>
Determinación de la integridad del RNA total	
Transferencia por capilaridad a una membrana de nylon	
Prehibridación e hibridación de la membrana	
<b><i>Hibridación tipo Southern Blotting</i></b>	<b>25</b>
Determinación de la integridad y purificación del DNA	
Restricción del DNA	
Despurinación parcial, desnaturalización y neutralización del gel de agarosa que contenía el DNA restringido	
<b>RESULTADOS</b>	
Obtención de la sonda específica para la AOx	<b>28</b>
Transgénesis de los diferentes lotes de <i>Nicotiana tabacum</i>	<b>29</b>
Expresión génica de la AOx en plantas transformadas de tabaco	<b>32</b>
Expresión génica de la AOx en plantas de maíz	<b>36</b>
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS</b>	<b>39</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>41</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>42</b>
<b>APÉNDICE A</b>	<b>45</b>
<b>APÉNDICE B</b>	<b>46</b>



# ABREVIATURAS

---

---

<b>ADP</b>	Adenosindifosfato
<b>AOx</b>	Oxidasa Alterna
<b>ATC</b>	Ácido tricloro acético
<b>ATP</b>	Adenosintrifosfato
<b>BrEt</b>	Bromuro de etidio
<b>BSA</b>	Albúmina sérica bovina
<b>CTE</b>	Citocromo Oxidasa
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetracético
<b>EROs</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>HCl</b>	Ácido clorhídrico
<b>H<sub>2</sub>O-DEPC</b>	Agua bidestilada tratada con dietilpirocarbonato
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrógeno
<b>KCN</b>	Cianuro de potasio
<b>MOPS</b>	Ac. 3-N-morfolinopropanesulfónico
<b>NaCl</b>	Cloruro de sodio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sodio
<b>nOg</b>	n-propil-galato
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>SHAM</b>	Ácido salicil-hidroxiámico
<b>SSC</b>	Solución de citrato de sodio y cloruro de sodio
<b>TE</b>	Solución de tris-HCl (pH 8) y EDTA
<b>Tris-HCl</b>	Hidroximetil amino metano pH ajustado con HCl
<b>LB</b>	Medio luria
<b>NADH</b>	Nicotinadenin dinucleótido

# ÍNDICE DE FIGURAS

---

---

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Formación de EROs.	3
<b>Figura 2.</b> Producción de EROs en las plantas.	4
<b>Figura 3.</b> Mitocondria.	5
<b>Figura 4.</b> Cadena transportadora de electrones	6
<b>Figura 5.</b> Enzima AOx	9
<b>Figura 6.</b> Localización celular de enzimas antioxidantes	11
<b>Figura 7.</b> Localización celular de compuestos antioxidantes	11
<b>Figura 8.</b> Purificación del inserto de AOx	28
<b>Figura 9.</b> Análisis de DNA de tabaco	30
<b>Figura 10.</b> Análisis de DNA de maíz	31
<b>Figura 11.</b> Cuantificación densitométrica del DNA hibridado de tabaco	32
<b>Figura 12.</b> Análisis del RNA de tabaco	33

<b>Figura 13.</b> Cuantificación densitométrica del RNA hibridado de tabaco	34
<b>Figura 14.</b> Efecto del estrés hídrico en plantas transgénicas de tabaco	35
<b>Figura 15.</b> Hojas de plantas transgénicas de tabaco crecidas en estrés hídrico	36
<b>Figura 16.</b> Análisis del RNA de maíz	36
<b>Figura 17.</b> Cuantificación densitométrica del RNA hibridado de maíz	37
<b>Figura 18.</b> Peso seco de maíz	38

# RESUMEN

---

---

El estrés abiótico es uno de los factores más importantes que limita la productividad vegetal y el rendimiento de las cosechas. Esta limitación se debe en parte a los efectos deletéreos causados por las especies reactivas de oxígeno (EROs). La importancia de este estudio es contribuir en la solución de esta limitación aumentando la capacidad de las plantas para contender con las EROs. Una forma de lograr esto es incrementando la actividad de una enzima localizada en la membrana interna mitocondrial llamada oxidasa alterna (AOx), cuya función es evitar la producción de EROs.

Utilizando técnicas de manipulación genética el Dr. M. A. Gómez Lim (CINVESTAV; Irapuato) desarrolló diferentes lotes de plantas de *Nicotianna tabacum*, con varias dosis del gene de la AOx, las cuales empleamos para realizar nuestros experimentos. También se estudiaron dos cultivares de maíz, que mostraron diferente contenido de AOx. Los resultados indican que las plantas con mayor expresión de AOx también presentan mayor resistencia al estrés hídrico, el cual constituye un tipo de estrés abiótico.

# INTRODUCCIÓN

---

---

Debido a su carácter sésil, las plantas pueden sufrir estrés. Este estrés se genera por situaciones ambientales desfavorables como lo son periodos prolongados de sombra, luz, altas y bajas temperatura, sequía, etc. Se sabe que el estrés produce daños muy importantes en el organismo que se encuentre bajo sus efectos. Este daño es provocado, al menos en parte, por las EROs.

## **Especies Reactivas de Oxígeno (EROs)**

### *¿Qué es un radical?*

Los electrones de átomos y moléculas ocupan regiones del espacio denominadas orbitales. Cada orbital solo puede contener dos electrones como máximo. Cuando en un orbital externo hay un solo electrón, se dice que ese electrón no esta apareado. Si una especie atómica o molecular tiene uno o más electrones no apareados (número total impar de electrones), se dice que es un radical libre o simplemente un radical (Simontachi, 2003).

### *Características reactivas de los radicales*

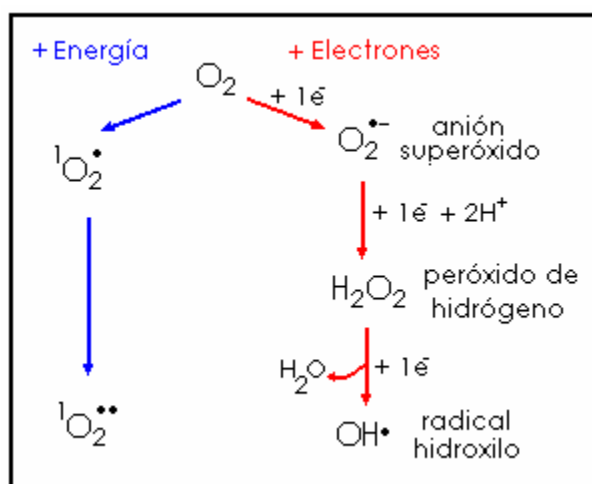
Los radicales son especies químicas muy reactivas, con capacidad de existir de forma independiente y que buscan con avidez completar su par electrónico. Esto lo pueden lograr mediante la reacción entre dos radicales, con lo cual ambos dejan de serlo, o bien sustrayendo un electrón de otra molécula, la cual se convierte en un radical. Este último mecanismo puede dar lugar a reacciones en cadena, es decir, la propagación del fenómeno inicial (Rodríguez, Hamabata; 2001).

### *El oxígeno como radical*

El oxígeno molecular ( $O_2$ ) es un birradical, porque tiene dos electrones no apareados en su orbital externo, ambos con el mismo giro (paralelo). La presencia de estos dos electrones con el mismo giro o spin representa una limitación del oxígeno para reaccionar con algunas sustancias. Sin embargo, si se resuelve esta

limitación activando al oxígeno, éste puede reaccionar fuertemente con todo tipo de sustancias. Los radicales producidos por la activación del  $O_2$  se denominan EROs, estas especies son mas reactivas que el  $O_2$  y en consecuencia, son más tóxicas. (Fridovich, 1998).

La activación del oxígeno ocurre mediante dos mecanismos (figura 1). El primero implica la absorción de suficiente energía química, luminosa o térmica para revertir el giro de uno de los electrones. El segundo consiste en reducciones monovalentes (transferencia de un solo electrón) que se dan en reacciones secuéciales (Rodríguez, Hamabata; 2001).



**Figura 1.** Formación de EROs por la activación del oxígeno molecular mediante reducciones univalentes (+ electrones) y por captación de energía (+ energía); (modificado de Rodríguez y Hamabata, 2001).

Mediante la absorción de energía se produce el singlete de oxígeno ( $^1O_2^*$ ), que involucra la redistribución de los electrones en el mismo orbital, no hay adición de electrones (Figura 1). Por reducciones monovalentes sucesivas se producen el radical superóxido ( $O_2^{\bullet -}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), el radical hidroxilo ( $OH^*$ ; Fig.1). La incorporación de un cuarto electrón conduce a la formación de agua (Apel, Hirt; 2004). Así, el oxígeno, siendo un elemento imprescindible para la vida, puede convertirse en una sustancia altamente deletérea por un simple intercambio de electrones.

## Producción de EROS en la célula

La producción de EROs es una consecuencia inevitable de la vida aeróbica. Su producción es considerada como una característica universal de estrés (Carrillo y Valle, 2005). Son generadas en diferentes compartimientos celulares (figura 2) como consecuencia del funcionamiento celular defectuoso de vías metabólicas y en procesos fisiológicos normales (Allen, 1995 y Apel, Hirt; 2004).

Las plantas producen activamente EROs como moléculas de señalización para el control de procesos como la muerte celular programada, respuesta al estrés abiótico y defensa contra patógenos. (Mittler, 2000). Sin embargo, son continuamente producidas en la mitocondria, en los cloroplastos (fotosíntesis) y en los peroxisomas (Apel, Hirt; 2004 y Mittler, 2000).

En la cadena respiratoria de la mitocondria las EROs se producen cuando la NADH deshidrogenasa y la ubiquinona reducida son capaces de transferir electrones al  $O_2$  de manera accidental, generando  $O_2^-$  (Carrillo, Valle; 2005).

Producción	Localización	ERO
Fotosíntesis PSI <sup>1</sup> o II	Cloroplasto	$O_2^-$
Respiración TE <sup>2</sup>	Mitocondria	
Clorofila excitada	Cloroplasto	
NADPH oxidasa	Membrana plasmática	
Xantina oxidasa	Apoplasto	
Glicolato oxidasa	Peroxisoma	$H_2O_2$
Ácidos grasos ( $\beta$ -oxidación)	Peroxisoma	
Oxalato oxidasa	Peroxisoma	
Amino oxidasa	Apoplasto	$H_2O_2$ y $O_2^-$
Peroxidasas y NADH	Pared celular	

**Figura 2.** Producción de EROs en las plantas (modificado de Mittler, 2002).  
1. Fotosistema; 2. Transporte de electrones.

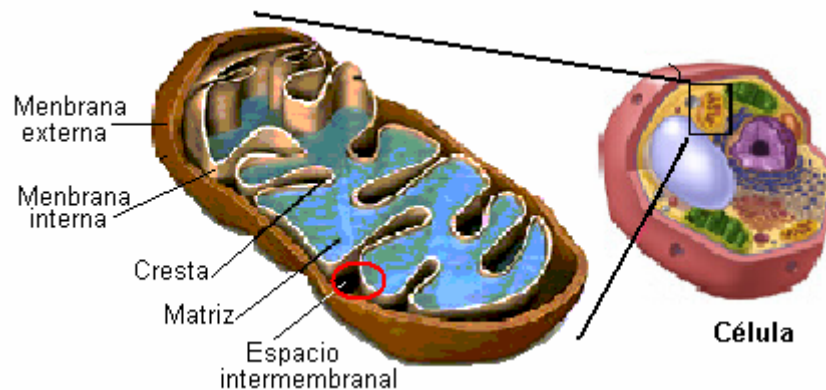
En este trabajo tiene especial relevancia la cadena transportadora de electrones de la mitocondria por lo que a continuación se describirá la estructura mitocondrial y la de los complejos transportadores de electrones.

### ***Estructura mitocondrial***

La mitocondria es el sitio donde se lleva acabo el metabolismo oxidativo eucariótico, se ha demostrado que este organelo contiene enzimas que regulan las

reacciones que aquí se llevan a cabo, como la piruvato deshidrogenasa, enzimas del ciclo del ácido cítrico, enzimas que catalizan la oxidación de los ácidos grasos, enzimas y proteínas que participan en el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, además de proporcionar energía en forma de ATP (Voet, Voet; 1995).

Las mitocondrias son cuerpos de forma variable: filamentos, bastoncillos o esferas. El número de mitocondrias en la célula varía de unas pocas a más de un millar. La mitocondria está formada por dos membranas, una membrana mitocondrial externa y membrana mitocondrial interna (figura 3). Ambas membranas protegen a la mitocondria y son de gran importancia para todas las funciones que se llevan a cabo dentro de ella (Alonso, 2003).



**Figura 3.** Representación esquemática de la mitocondria.

La membrana externa es fácilmente permeable a pequeñas moléculas e iones. La membrana interna mitocondrial se pliega sobre sí misma para dar lugar a numerosas invaginaciones llamadas crestas (Voet y Voet, 1995). Además, es impermeable a la mayoría de las moléculas pequeñas e iones, incluido el protón ( $H^+$ ). Las únicas especies que cruzan esta membrana son aquellas que utilizan proteínas transportadoras específicas (Lehninger, 1993).

La membrana interna mitocondrial aloja a los componentes de la cadena respiratoria y el complejo enzimático responsable de la síntesis de ATP, por lo que puede contener más de 10 000 conjuntos de sistemas de transferencia de electrones (cadenas respiratorias) y de moléculas de ATP sintasa, distribuidas por toda la superficie de esta membrana (Lehninger, 1993).



## ***Cadena mitocondrial transportadora de electrones***

En plantas, la cadena mitocondrial de transporte de electrones consta de dos rutas, una de ellas es la ruta de la citocromo oxidasa (Cit Ox) y la otra ruta es la oxidasa alterna (AOx, figura 4).

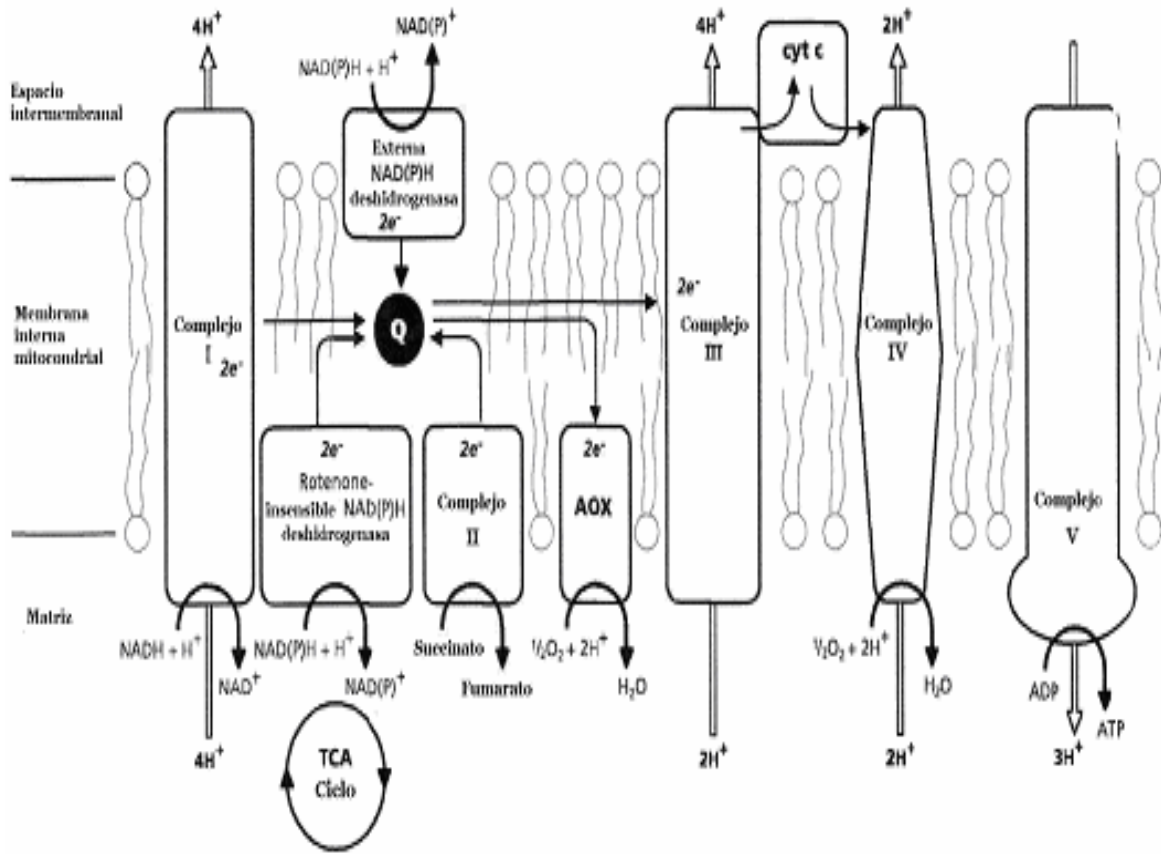


Figura 4. Representación esquemática de la cadena mitocondrial transportadora de electrones en plantas (Disponible en Plant physiology on line: the alternative oxidase chapter 11 topic 11.3 <http://3e.plantphys.net/article.php?ch=t&id=148>)

La mayoría de los componentes de la cadena son proteínas integrales de membrana, con grupos prostéticos capaces de aceptar y donar 1 o 2 electrones. Cada componente de la cadena puede aceptar electrones del transportador precedente y transferirlo al siguiente en una secuencia específica (Alonso, 2003).

El  $\text{NAD}^+$  y las flavoproteínas funcionan como transportadores de electrones unidos a hidrógenos, mientras que otros grupos transportan solo electrones, como son: la benzoquinona hidrofóbica (llamada también ubiquinona, coenzima Q o UQ) y dos tipos diferentes de proteínas con hierro (citocromos y proteínas fierro-azufre)

(Lehninger, 1993). Las hidrogenasas están ligadas a la poza de ubiquinona, la cual es reducida por la entrada de electrones mediante las hidrogenasas y oxidada por la Cit Ox y/o por la AOx. La poza de ubiquinona consiste de una parte oxidada (ubiquinona) y una parte reducida (ubiquinol). Cuando la poza de ubiquinona se encuentra reducida, los electrones son donados a la AOx.

Los equivalentes producidos (NADH y FADH<sub>2</sub>) en el ciclo de los ácidos tricarbónicos entran en la cadena como donadores de electrones (Guzmán, 1996).

La reacción global catalizada por la cadena transportadora de electrones o cadena respiratoria mitocondrial consiste en transportar electrones, desde el NADH, FADH<sub>2</sub> o succinato a través de las flavoproteínas, ubiquinona y citocromos al oxígeno (Lehninger, 1993). Los transportadores de electrones o complejos que componen a la cadena reciben los siguientes nombres y tienen las siguientes funciones:

#### Complejo I: NADH deshidrogenasa

Se compone de 16 subunidades y de varios grupos prostéticos como la flavinmononucleótido (FMN) (Guzman, 1996). Este enorme complejo de flavoproteína está orientado de modo que su sitio activo mira hacia la matriz mitocondrial para poder interactuar con el NADH. El NADH es un nucleótido proveniente del ciclo del ácido cítrico. El complejo I transfiere dichos electrones por acción de la NADH deshidrogenasa a la ubiquinona. Este movimiento va acompañado de una extrusión de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal (Alonso, 2003).

#### Complejo II: Succinato deshidrogenasa

Es la única enzima del ciclo del ácido cítrico que está ligada a la membrana interna mitocondrial. Este complejo transfiere electrones del succinato a la ubiquinona. En esta etapa no se produce translocación de protones a través de la membrana.

#### Complejo III: Complejo bc<sub>1</sub> o ubiquinona-citocromo c oxidoreductasa

Transporta electrones de la CoQ o ubiquinona al citocromo c. En esta etapa hay translocación de protones.

### Complejo IV: Citocromo c oxidasa

Constituido por la enzima citocromo oxidasa (Cit Ox). Utiliza al citocromo c (Cit C) como sustrato. La enzima toma 4 electrones del Cit C y los transfiere a dos moléculas de oxígeno y hay translocación de protones.

#### ***Oxidasa Alterna (AOx)***

La AOx se encuentra presente en la mitocondria de las plantas y en algunos hongos y protistas (Day, 1991), específicamente en la membrana interna de este organelo celular.

La AOx de plantas es un dímero funcional (Sierra-Campos, *et al*; 2005), unido de forma no covalente entre cada subunidad (forma activa: reducida) o pueden estar unida covalentemente mediante un puente disulfuro (figura 4; forma inactiva: oxidada. Cruz-Hernández, Gómez-Lim; 1995). En su forma reducida, la AOx es más activa comparada con su forma oxidada (Umbach, Siedow; 1993;).

Su sitio activo (que contiene Fe) y su sitio regulador redox (que contiene cisteína), están expuestos hacia la matriz mitocondrial (Cruz-Hernández, Gómez-Lim; 1995 y Umbach; 1994).

En cada subunidad de la AOx próximo al carbono terminal contienen un centro binuclear de fierro y en la proximidad del amino terminal contienen un residuo conservado de cisteína. Este residuo de cisteína está involucrado en la dimerización de las subunidades de la AOx (figura 5).

La AOx transfiere electrones desde la ubiquinona hasta el oxígeno generando agua como producto. Durante esta reacción se transfirieron 4 electrones al oxígeno. Una característica importante de AOx es que no bombea protones a través de la membrana, por tanto, la energía de flujo de electrones a través de la AOx se pierde en forma de calor (Sierra-Campos, 2005) de tal manera que la conservación de la energía en forma de ATP es mucho menor cuando la AOx está activa (Cruz-Hernández, Gómez-Lim; 1995). La cantidad total presente de la AOx varía con la edad y con la capacidad de la ruta (Cruz-Hernández, Gómez-Lim; 1995).

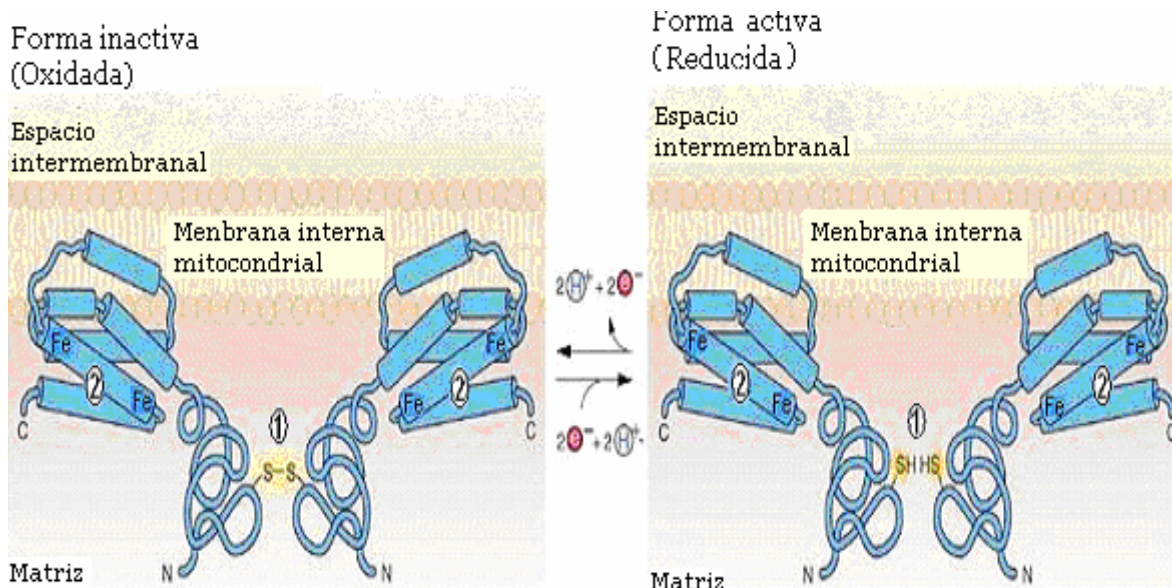


Figura 5. Representación esquemática de la enzima. **1** Sulfuros involucrados en el sitio regulación (redox) y **2** fierros involucrados en el sitio activo. **C** y **N** indican el carbono y el nitrógeno terminal de la proteína. AOX (modificada de Cruz-Hernández, Gómez-Lim, 1999).

La actividad de la ruta de la AOX es resistente a los inhibidores de la ruta Cit Ox por ejemplo al KCN, a la azida, a la antimicina A y al  $\text{H}_2\text{O}_2$ ; además, estos inhibidores inducen la expresión de la enzima AOX. Sin embargo, la AOX es sensible a algunos compuestos como el SHAM y el nOg (Moore, 1991 y Cruz-Hernández, Gómez-Lim; 1995).

La AOX se activa por  $\alpha$ -cetoácidos (principalmente piruvato) a través de la formación de un tiohemicetal con una cisteína conservada, lo cual incrementa la afinidad de la enzima por el ubiquinol (Umbach *et al.*, 1994).

Algunas de las funciones de la AOX son:

- Mantener el flujo de carbono a través de la oxidación de NADH y  $\text{FADH}_2$  cuando existen condiciones limitadas de ADP y la ruta Cit Ox esta restringida, gracias a esto el ciclo de Krebs y la glicólisis pueden continuar y proporcionar a la célula precursores biosintéticos (Sierra-CamposM; 2005).
- Generar calor para activar la termogénesis de flores, esto produce la volatilización de compuestos aromáticos para que las flores sean más atractivas para ser polinizadas (Cruz-Hernández, Gómez-Lim; 1995).
- La AOX en plantas también tiene una función antioxidante contra el estrés oxidativo, por que limita la formación de las EROs. Cuando la poza de

ubiquinona se encuentra es un estado de reducción elevado promueve la formación de EROs además de la inhibición y/o restricción de la ruta de la Cit OX. Se ha propuesto que, al mantener oxidada a la poza de ubiquinona la AOX estabiliza el estado de reducción de la poza, evitando la formación de EROs (Millar, Day; 1996).

## **Mecanismos de defensa contra las EROs**

Aún bajo condiciones óptimas de funcionamiento, no menos del 5% de los electrones transferidos durante la fotosíntesis y la respiración van a dar al O<sub>2</sub> y producen EROs (Fridovich, 1998).

Los mecanismos de defensa de las células pueden eliminar estos compuestos sin mayores dificultades; incluyen antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos (Buchanan, Wruissem; 2000).

El O<sub>2</sub><sup>-</sup> es eliminado por la superóxido dismutasa (SOD). Es una familia de metaloenzimas que catalizan la siguiente reacción:  $2 O_2^- + 2H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$ .

Estas isoenzimas fueron encontradas en varios compartimentos celulares y contienen como cofactores Cu<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> o Mn<sup>2+</sup> (Allen, 1995).

La catalasa (CAT) y el ascorbato (vitamina C) convierten al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua. La ascorbato peroxidasa (APX) es el principal inactivador del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el cloroplasto y en el citosol de las células de las plantas (Allen, 1995). El radical OH<sup>-</sup> se elimina por la vía de la glutatión peroxidasa (figura 6).

El daño de las EROs también son eliminadas por compuestos químicos antioxidantes como la vitamina E y los carotenoides (figura 7).

En algunas plantas la exposición a situaciones que generan estrés oxidativo pueden estimular la síntesis de metabolitos antioxidantes y aumentar la actividad de enzimas antioxidantes.

Antioxidante	Abreviatura	Localización
Ascorbato peroxidasa	APX	Cl <sup>1</sup> ; Cit <sup>2</sup> ; Mit <sup>3</sup> ; Per <sup>4</sup> ; Apo <sup>5</sup> ; Est <sup>6</sup>
Catalasa	CAT	Per
Dihidroascorbato reductasa	DHAR	Cit
Glutation reductasa	GR	Cit
Monodihidroascorbato reductasa	MDHAR	Est
Superóxido dismutasa	Cu/Zn SOD Mn SOD FeSOD	Cl, Cit, Mit, Per, Apo

**Figura 6.** Localización celular de mecanismos de defensa de enzimas antioxidantes. 1. Cloroplasto 2. Citosol; 3. Mitocondria; 4. Peroxisoma; 5. Apoplasto; 6. Estroma (modificado de Buchanan, Wruissem, 2000).

Antioxidante	Localización
Ascorbato (vitamina C)	Apoplasto, citosol, vacuola
$\beta$ -caroteno	
Glutation reducida (GSH)	Mitocondria, citosol
Poliaminas	Nucleo mitocondrial, citosol
$\alpha$ -tocoferol	Membrana celular
Zeaxantina	Cloroplasto

**Figura 7.** Localización celular de compuestos de defensa antioxidante (modificado de Buchanan, Wruissem, 2000).

## Estrés oxidativo en las células

El estrés oxidativo es un estado de la célula en el cual se encuentra alterado el balance óxido-reducción intracelular, es decir, el balance entre prooxidantes y antioxidantes. Este desbalance se produce cuando aumenta de manera anormal la producción de EROs y/o por deficiencia o falla en los mecanismos antioxidantes (Ríos, 2003). En plantas las situaciones ambientales adversas, transitorias o permanentes afectan este balance, desencadenando estrés oxidativo (Carrillo, Valle; 2005).

### *Efecto del estrés oxidativo en las células*

El aumento celular en la cantidad de EROs, tal que sobrepase la capacidad de los mecanismos de defensa, produce alteraciones en el DNA nuclear y mitocondrial, peroxidación de lípidos de las membranas mitocondriales y plasmática, inactivación de enzimas mediante catálisis metálica y alteración de proteínas produciendo derivados carbonílicos (Sorribas, 2003). Las moléculas dañadas y la naturaleza del efecto dependen de la ERO y del tipo de estrés (Carrillo,

Valle; 2005). Por ejemplo, el radical  $O_2^-$  destruye rápidamente los complejos hierro-azufre de las metalproteínas, con pérdida de hierro e inactivación de la enzima (Asada, 1999). Este radical puede actuar como un oxidante o como un agente reductor y, por lo tanto, puede oxidar una gran variedad de moléculas como los carbohidratos.

El  $H_2O_2$ , a su vez, inactiva moléculas biológicas, especialmente las que contiene grupos sulfhidrilo, grupos hierro-azufre, grupos hemo y grupos prostéticos con cobre. Además reacciona con metales de transición como el hierro formando radicales hidroxilos, (reacción de Haber-Weiss; Sorribas, 2003).

El radical  $OH\cdot$  es la especie más reactiva de todos los radicales de oxígeno, es altamente destructivo para los lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y proteínas (Buchanan, Wruissem; 2000).

### ***Estrés Abiótico***

Son condiciones ambientales adversas. Surgen de un exceso o una deficiencia de uno o varios fenómenos físicos o químicos ambientales externos:

- Alta o poca irradiación (UV)
- Sequía
- Contaminantes Atmosféricos como:  $NO_2$ ,  $O_3$  ozono
- Herbicidas
- Metales pesados
- Deficiencia mineral y de nutrientes
- Bajas y altas temperaturas
- Hiperoxia (respiración en exceso de oxígeno)
- Anoxia (Insuficiencia de aporte de oxígeno a los tejidos).
- Estrés hídrico

Todo tipo de estrés, genera como característica general aumento en la producción de EROs. Dependiendo de la magnitud del estrés y de su duración estas especies pueden sobrepasar los mecanismos antioxidantes y establecer una condición de estrés oxidativo. De tal manera que una planta al estar expuesta a un estrés ambiental o abiótico puede desencadenar en sus células estrés oxidativo (Allen, 1995).

El estrés ambiental representa, en conjunto, el factor limitante más importante para la productividad vegetal y el rendimiento de las cosechas (Allen, 1995). Este tipo de estrés desencadena un amplio rango de respuestas, la alteración en la expresión génica, cambios en el metabolismo celular y cambios en el crecimiento y rendimiento en la producción. La duración, la severidad y el tipo de estrés bajo el cual se encuentran las plantas influyen en la respuesta a ese estrés. Algunas características de la planta como tejido, estado de desarrollo y fenotipo, también influyen en la sensibilidad o resistencia al estrés (Buchanan, Wruissem; 2000).

De igual forma las situaciones ambientales adversas afectan diversas vías de utilización de NADPH, como la inhibición de varias enzimas claves del ciclo de Calvin y por consiguiente disminuye el nivel de NADP<sup>+</sup> en ausencia de su aceptor final, la cadena de transporte electrónico queda reducida (Carrillo, Valle; 2005). Estos intermediarios reducidos pueden transferir electrones de manera accidental al O<sub>2</sub> generando O<sub>2</sub><sup>-</sup> (Carrillo, Valle; 2005).

El radical superóxido es el precursor de las EROs. La producción del O<sub>2</sub><sup>-</sup> tiene lugar principalmente en las mitocondrias (Sorribas, 2003), durante la cadena transportadora de electrones. La mitocondria de la célula eucarionte es un importante sitio de generación de EROs en las plantas (Maxwell, 1999 y 2000).

### ***Uso de técnicas de biología molecular para incrementar la capacidad de las plantas para contender con el estrés oxidativo.***

Hoy en día, la manipulación de los ácidos nucleicos (empleo de métodos biotecnológicos, etc) es una práctica común para tratar y/o mejorar organismos vivos, especialmente bacterias, hongos, plantas, etc.

En el campo de la agricultura ha surgido un interés común en aumentar la capacidad de las plantas para disminuir el estrés oxidativo y por sus efectos negativos en la producción agrícola (Rodríguez, Hamabata; 2001). El incremento en la habilidad de la planta para contender con el estrés oxidativo se puede lograr aumentando la capacidad antioxidante de la planta o evitando la formación del radical superóxido. Lo primero se logra produciendo plantas transformadas que



sobre-expresen alguno de los genes de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPX, etc) o bien con el gene que evita la formación de superóxido (AOx). En la actualidad solo se ha utilizado la primer estrategia. Desafortunadamente, solo se ha logrado un moderado incremento en la resistencia al estrés. Por lo que sería deseable explorar el segundo enfoque.

# ANTECEDENTES INMEDIATOS

---

En el campo de la agricultura ha surgido un interés común en aumentar la capacidad de las plantas para disminuir el estrés oxidativo y sus efectos (Rodríguez, Hamabata; 2001). Esto se debe principalmente a las pérdidas generadas por factores ambientales (estrés abiótico). Boyer (1982) encontró que para los cultivos evaluados (maíz, trigo, soya, avena, cebada, etc.), cerca del 70% de estos cereales no alcanza su máximo potencial productivo por causas imputables a los factores abióticos del medio ambiente (Rodríguez, Hamabata; 2001).

El estrés abiótico genera un incremento en la producción de EROs, las cuales son las responsables, por ejemplo, de una falta de desarrollo y productividad en las plantas. La producción del radical superóxido constituye el primer eslabón en la generación de EROs y tiene lugar en las mitocondria durante la cadena transportadora de electrones (CTE; Sorribas, 2003).

Lo reportes de (Maxwell, 1999 y 2000) señalan a la CTE de la mitocondria de células eucariotas como un importante sitio de generación de EROs en las células de las plantas. Asimismo, se estableció que la mitocondria es el principal blanco del daño oxidativo en condiciones de sequía (Bartoli, 2004). Además, las EROs pueden causar daño a proteínas, lípidos y DNA al conducir a la célula hacia su muerte; por lo que es imprescindible mantener bajo control su nivel de producción (Cruz-Hernández, Gómez-Lim; 1995).

Diversas evidencias han demostrado que la AOX, al mantener oxidada a la poza de ubiquinona, evita la formación de EROs en la mitocondria (Millar, Day;1996 y Maxwell, 2002) durante y después de la exposición de tejidos vegetales a un determinado estrés (Alonso, 2003).

La expresión de esta enzima se regula a nivel de transcripción, por lo que el incremento en actividad de la AOX está directamente relacionada con el incremento en la cantidad de la proteína AOX y correlacionada, a su vez, con un incremento en la cantidad de los transcritos correspondientes (Finnegan *et al.*, 1999).

# HIPOTESIS

---

---

La AOX es una enzima mitocondrial que evita la formación de EROs; por lo que es de esperarse que plántulas con mayores niveles de expresión de esta enzima presentaran menor daño oxidativo causado por el estrés hídrico.

# OBJETIVOS

---

---

## ❖ **General**

Establecer la participación de la oxidasa alterna en la tolerancia a la sequía durante el desarrollo de plántulas de maíz y de tabaco transgénico.

## ❖ **Particular**

Determinar el efecto del estrés hídrico en el desarrollo de plántulas de *Zea mays* y plantas transformadas de *Nicotiana tabacum*.

Detectar y estimar el nivel de expresión de la AOx en *Zea mays* y plantas transformadas de *Nicotiana tabacum* en condiciones normales de crecimiento y bajo condiciones de estrés hídrico.

# MATERIALES Y MÉTODOS

---

---

## Material Biológico

- **Maíz (*Zea mays*)**. Se utilizaron hojas de plantas de maíz *tepecintle 100* y *pepitilla 49* de aproximadamente 20 días de crecimiento en condiciones de invernadero. De estas hojas se tomaron algunas para los siguientes tratamientos:

1. Estrés por sequía. Se utilizaron las hojas que después de 14 días de crecimiento normal se les suspendió el riego por 5 días y se recolectaron el día 19, contados a partir de que fueron sembradas.

Peso seco. Las hojas de las plantas control (sin ningún tipo de estrés) de maíz y las hojas de plantas estresadas por sequía se pesaron y se fraccionaron. Se introdujeron en cajas de aluminio previamente pesadas. Se colocaron en una estufa al vacío a 60 °C. Las muestras se mantuvieron en estas condiciones hasta que alcanzaron peso seco constante. Antes de pesarlas se dejaron enfriar a temperatura ambiente en un desecador con sílica. El peso seco se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Peso de la muestra seca}}{\text{Peso de la muestra húmeda}} \times 100 = \% \text{ de peso seco}$$

La determinación se hizo por triplicado para cada lote.

2. Estrés por oxidantes. Se fraccionaron las hojas y se sumergieron en una solución 100 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con infiltración al vacío por 2.5 min. Posteriormente se dejaron escurrir y se incubaron a 25 °C por 2 h.

- **Tabaco (*Nicotiana tabacum*)**. Las semillas de tabaco transformadas con una construcción conteniendo el gene de la AOX de mango bajo el promotor del virus de la coliflor utilizadas en este trabajo fueron proporcionadas por el Dr. M. A. Gómez Lim (CINVESTAV, Irapuato). Se emplearon hojas de plantas de tabaco de aproximadamente 2 meses de crecimiento. Las semillas silvestres y las de líneas

transformadas 9A, 9B, 12C y 13B, con el gene de la AOX de mango, se sembraron en medio MS adicionado para emplearlas como control.

1. Estrés por sequía. Los mismos lotes de semillas también fueron sembradas en el medio anterior pero adicionado con polietilenglicol (PEG) como agente estresante debido a que este compuesto atrapa agua generando en la planta estrés hídrico.

## **Métodos**

Para los siguientes métodos experimentales que a continuación se describen se empleó una centrífuga *Eppendorf 5415C* con un radio del rotor de 7.0 cm.

### **Obtención de la sonda específica para la AOX**

#### *Clonación del inserto*

Se utilizaron células competentes DH5- $\alpha$  y el vector (pPCR-Script Amp, stratagene; apéndice A) con la secuencia específica para la AOX de maíz a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Las células competentes, se descongelaron en hielo y se les adicionó 1  $\mu\text{L}$  del vector bajo condiciones de ambiente estéril. Se dejó reposar en hielo por 30 min y después se incubó a una temperatura de 42° C por 42 s. Inmediatamente después se colocó en hielo por 2 min. Posteriormente se le adicionaron 400  $\mu\text{l}$  de solución SOC (LB + glucosa 1M). Se incubó 30 min a 37° C con agitación (250 rpm). Se centrifugó a 14 000 rpm por 2 min. Se retiraron 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante y con el resto del sobrenadante se resuspendió la pastilla. Esta suspensión celular se plaqueó en una caja de petri con medio LB selectivo con ampicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se incubó toda la noche a 37° C.

#### *Selección fenotípica y purificación de las clonas celulares transformadas*

Del cultivo anterior se seleccionaron las colonias aisladas y cada una de ellas se inoculó en un tubo con 3 mL de medio LB líquido selectivo con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Se incubaron con agitación (250 rpm) a 37° C durante toda la noche. Con la finalidad de purificar y re-seleccionar las colonias transformadas, los cultivos líquidos anteriores, por separado, se resembraron por estriado en cajas petri con

medio LB selectivo con ampicilina (100 µg/mL). Se dejaron incubando a 37° C toda la noche. Al día siguiente se volvieron a seleccionar las colonias aisladas y se sembraron en medio LB líquido selectivo con ampicilina (100 µg/mL). Se dejaron incubando a 37° C toda la noche con agitación (250 rpm).

### Purificación del plásmido

El plásmido se aisló de los cultivos líquidos anteriores, utilizando el protocolo Genelute Plasmid miniprep Kit (Marligen Biosciences). El total de las células de cada uno de los cultivos se colectó en un tubo eppendorf diferente, centrifugando alícuotas de 1 mL, cada alícuota fue centrifugada por 2 min a 13000 rpm. La pastilla de células se resuspendió en 200 µL de solución de resuspensión, y se añadieron 200 µL de solución de lisis (soluciones proporcionadas por el fabricante). El tubo se invirtió suavemente de 5 a 6 veces y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se le añadieron 350 µL de solución de neutralización y se mezcló por inversión de 4 a 6 veces. Se centrifugó 10 min a 12000 rpm. El sobrenadante se transfirió a una columna de purificación y se centrifugó 1 min a 12000 rpm. El sobrenadante resultante se eliminó. Posteriormente se le adicionaron a la columna 500 µL de solución de lavado, se incubó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 12000 rpm. El sobrenadante resultante se eliminó. Enseguida se le adicionó 700 µL de una solución de lavado que contiene etanol y se centrifugó por 1 min a 12000 rpm. El sobrenadante resultante se eliminó. La columna se colocó en un tubo colector y se añadieron 45 µL de solución de elusión se incubó 1 min a temperatura ambiente y se centrifugó por 1 min a 12000 rpm quedando el plásmido purificado en el tubo colector que se almacenó a -20° C. De esta manera se obtuvieron diferentes tubos colectores con el posible plásmido de interés.

### Digestión del plásmido para liberar el inserto

Las enzimas de restricción utilizadas fueron EcoRI y Not I debido a que el plásmido contiene un sitio de restricción para cada enzima en el sitio de clonación donde se insertó el DNA de la AOx. En un tubo estéril se colocaron 45 µL del

plásmido purificado, 1  $\mu\text{L}$  de Not I, 1.5  $\mu\text{L}$  EcoRI, 2  $\mu\text{L}$  de agua estéril y 5.5  $\mu\text{L}$  del amortiguador 10X (proporcionado por el fabricante). Esta mezcla se incubó a 37° C alrededor de 15 h. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, en el cual se corrieron las reacciones de digestión para determinar cual de estos corresponde al inserto de AOx de acuerdo a su peso molecular de aproximadamente 500 pb.

### Purificación del inserto

Una vez liberado el inserto de la AOx del plásmido, se purificó utilizando el protocolo DNA Gel Extraction Kit (MILLIPORE). Se cortó de un gel de agarosa al 1% de electroforesis la banda de DNA de interés con la ayuda de un transiluminador de UV y una navaja de un filo nueva. El fragmento de agarosa conteniendo el DNA de interés se coloca en la columna de purificación. Se centrifuga 10 min a 5000 rpm y en el sobrenadante resultante se encontró el inserto purificado. Se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### Marcado radiactivo del inserto: sonda

Se realizó empleando el protocolo Nick Translation Kit (Amersham Biosciences). Se colocó en un ependorff 1  $\mu\text{g}$  de DNA (inserto puro) y se le añadió 20  $\mu\text{L}$  de amortiguador (proporcionado por el fabricante), 10  $\mu\text{L}$  [ $\alpha^{32}$ ] dCTP agua hasta completar un volumen de 100  $\mu\text{L}$  y se mezcló. Se adicionó 10  $\mu\text{L}$  de enzima y se incubó por 2 h a 15  $^{\circ}\text{C}$ . Transcurrido el tiempo se detuvo la reacción con 10  $\mu\text{L}$  de EDTA 0.2 M pH 8.0.

### Purificación de la sonda

Se purificó la sonda marcada de los nucleótidos no incorporados de la siguiente manera: a un tubo de 600  $\mu\text{L}$  se le hicieron tres orificios con la ayuda de un alfiler caliente. Se rellenó en la punta con fibra de vidrio y se colocó dentro de otro tubo ependorf de 2500  $\mu\text{L}$ . Se añadió 500  $\mu\text{L}$  de Sepharosa G-10 y se centrifugó 3 minutos a 3500 rpm. Se repitió este paso hasta que quedó lleno de



Sepharosa G-10, no dejando secar la fibra. Inmediatamente se colocó la sonda en el tubo ependorff con Sepharosa y centrifugó 5 min a 3000 rpm.

### Cuantificación de la sonda marcada

Se forró un soporte de unicel con papel aluminio y se clavaron 4 papeles filtro whatman de 2.4 cm de diámetro con un alfiler. Se marcó cada papel filtro y se colocaron 5  $\mu$ L de la sonda en cada centro del papel. Secos los papeles dos de ellos se transfirieron a un vaso que contenía aproximadamente 150 mL de una solución fría de ATC al 5 % con 20 mM de pirofosfato de sodio. Se agitó por 2 min y se eliminó la solución; y se le volvió adicionar 150 mL de ATC al 5% con 20 mM de pirofosfato de sodio frío. Transcurrido el tiempo se transfirieron los papeles filtro a otro vaso que contenía aproximadamente 150 mL de etanol al 70% agitando por poco tiempo. Se sacaron los dos papeles filtro de esta solución y se dejaron secar en el soporte de unicel. Una vez secos se procedió a la cuantificación en frascos tipo vial que contenían 5 mL de líquido de centelleo.

## **Obtención de ácidos nucleicos**

### Aislamiento de RNA Total

Las hojas de plantas de maíz se lavaron sumergiéndolas durante cinco minutos en una solución de Tritón X 100, agitándolas manualmente, transcurrido el tiempo se enjuagaron con agua bidestilada estéril, se escurrieron y se secaron. Las hojas de tabaco se utilizaron de manera directa, es decir, sin ningún tratamiento previo de limpieza debido a que estaban en un medio de cultivo estéril.

La extracción del RNA total se realizó empleando el reactivo TRIzol® (Invitrogen), que es una solución monofásica de fenol e isocianato de guanidina. Para cada muestra se pesaron 100 mg de tejido. A esa cantidad de tejido se le adicionó 1 ml de trizol; se homogenizó con un triturador de tejidos politrón y se centrifugó por 10 min a 12000 rpm a una temperatura de 4 °C.

Posteriormente, el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio incubándolo por 5 min a una temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se adicionó 200  $\mu$ L

de cloroformo y se agitó por inversión. Se incubó por 3 min a una temperatura ambiente y se centrifugó 15 min a 12000 rpm a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se le adicionó 500 µL de isopropanol y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. El tubo se centrifugó por 10 min a 12000 rpm a una temperatura de 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 mL de una solución de etanol al 75%. Se mezcló en vortex. A continuación se centrifugó por 5 min a 7500 rpm a una temperatura de 4 °C. Se secó la pastilla al vacío por 5 min y se resuspendió en 20 µL de amortiguador de TE.

### *Aislamiento de DNA*

El tratamiento previo de las muestras se realizó de la misma manera como se efectuó para la extracción de RNA.

Se extrajo DNA empleando el reactivo DNAzol® (Invitrogen). Para cada muestra se pesaron 50 mg de tejido. A esa cantidad de tejido se le adicionó 1 ml de DNAzol; se homogenizó con un triturador de tejidos politron y se centrifugó por 10 min a 12000 rpm a 4 °C. Posteriormente, se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio, se adicionó 500 µL de etanol y se agitó por inversión. Se incubó a temperatura ambiente por 3 min. Se centrifugó por 10 min a 10000 rpm a una temperatura de 4 °C. El sobrenadante fue eliminado y la pastilla se lavó con 800 µL una solución de etanol al 75 %, seguido de una agitación en vortex. El tubo fue centrifugado por 2 min a 12000 rpm a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y se secó la pastilla al vacío por 5 min y se resuspendió en NaOH 8 mM. Se incubó a 37° C por 15 minutos. Se centrifugó 10 min a 12000 rpm a temperatura ambiente y se transfirió a un tubo limpio. Se neutralizo con 1/20 vol de Tris-HCl 1M (pH 8).

### *Cuantificación de ácidos nucleicos*

La cuantificación del DNA y del RNA se realizó por espectrofotometría a una  $A_{260}$ , considerando que una unidad de densidad óptica a 260 nm equivale a 40 µg/mL de RNA o a 50 µg/mL de DNA. Se realizó una segunda medición a una longitud de onda de  $A_{280}$  para detectar la posible contaminación con proteínas. La

relación de absorbencia 260 a 280 debe ser del orden de 2.0 e indica el grado de pureza del ácido nucleico.

## **Hibridación tipo Northern Blotting**

### *Determinación de la integridad del RNA total*

Se realizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % (0.6 g de agarosa, 4 mL de amortiguador MOPS 0.2 M, 1.2 mL de formaldehído al 37 % y 34.8 mL de H<sub>2</sub>O-DEPC) en condiciones desnaturalizantes. Se adicionaron 5 µL de bromuro de etidio para teñirlo. El amortiguador de corrida utilizado fue MOPS 0.02 M. Las muestras de RNA (10 µL) se prepararon utilizando dos partes del nucleico y una del amortiguador de carga (RLB 3x; 8 % v/v glicerol, 0.6 % formaldehído, 50 % de formamida desionizada, 0.02 M de MOPS y una mínima cantidad de azul de bromofenol). Enseguida se calentaron a 65 °C por 10 min y se dejaron enfriar en hielo por 5 min. Se separaron electroforéticamente a 110 V constates, con dimensiones del gel de aproximadamente 8 x 8 cm.

### *Transferencia por capilaridad a una membrana de nylon.*

Una vez fraccionado el RNA total se realizó la transferencia de las muestras a una membrana de nylon (Hybond- N+, Amersham Pharmacia Boitech) por capilaridad.

En un recipiente de plástico se colocó una base y alrededor de 300 ml de amortiguador SSC 10 x (1.5 M de cloruro de sodio y 0.15 M de citrato de sodio , pH7, líquido de transferencia), dentro del recipiente. Sobre la base se colocaron dos tiras de papel filtro previamente humedecidas en el líquido de transferencia, de modo que los extremos estuvieron en contacto con este líquido. Se eliminaron las burbujas. Después se colocó el gel invertido y se eliminaron las burbujas. Se colocó encima del gel la membrana de nylon del mismo tamaño del gel previamente humedecido en el líquido de transferencia. Se eliminaron las burbujas. Se colocó arriba de la membrana dos pedazos de papel filtro del mismo tamaño del gel previamente humedecidas en el líquido de transferencia. Se eliminaron las

burbujas. Se colocó encima aproximadamente 7 cm de papel periódico de igual tamaño y se colocó encima de este peso de aproximadamente 500 g. Después se cubrió con plástico adherente y dejó transferir 8-16 horas.

Transcurrido el tiempo, se retiró cuidadosamente la membrana, se colocó entre dos papeles filtro y se introdujo en un horno de vacío a 80° C por dos horas para secar la membrana. Se sometió la membrana a pulsaciones de rayos UV por 15 segundos para fijar el RNA covalentemente. Se lavó la membrana con SSC 2X durante 15 minutos con agitación constante (250 rpm) y luego 15 minutos con agua desionizada. Posteriormente se tiñó la membrana con azul de metileno.

### *Prehibridación e hibridación de la membrana*

La membrana con las muestras de RNA se colocó dentro de una bolsa de plástico con cierre hermético (ziploc) con una solución que contenía 1 % de BSA, 1mM de EDTA, 0.5 M de amortiguador de fosfatos pH 7.2, 7% de SDS; previamente calentada a 50°C. Se eliminaron todas las burbujas antes de cerrarla. Enseguida se colocó la bolsa dentro de un baño a 50°C durante 4 horas con agitación constante (300 rpm).

Transcurrido el tiempo de prehibridación se removió este medio y se le adicionó solución de hibridación (mismo medio empleado para prehibridar) previamente calentada a 50°. Se adicionó la sonda específica para la AOX, desnaturalizada (por ebullición durante 5 minutos a baño maría) al medio de hibridación. Se dejó hibridando a 50° C por 19 horas con agitación (300 rpm).

Una vez terminado el tiempo de hibridación, se lavó dos veces la membrana en una solución que contenía SSC 8x y 0.1% SDS a 50° C durante 2 minutos con agitación manual. Se determinó la radioactividad antes y después del lavado. Se expuso en una placa x-ray (kodak Photo Film) a -70°C.

## **Hibridación tipo Southern Blotting**

### **Determinación de la integridad y purificación del DNA**

Para determinar la integridad del DNA se realizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1 % como se indica en el protocolo de DNA Gel Extraction Kit (MILLIPORE) conteniendo 0.4 g de agarosa, 800  $\mu$ L de amortiguador TAE modificado (50 x) y 39.2 mL de H<sub>2</sub>O estéril. Se adicionaron 20  $\mu$ L de bromuro de etidio para teñirlo. El amortiguador de corrida utilizado fue una dilución del amortiguador TAE modificado (1x). La muestra de DNA se preparó utilizando una parte del nucléico y dos del amortiguador de carga (TAE 3x; glicerol 60%, azul de bromofenol y xylen cyanol 1 mg/mL). Se corrió en una cámara para electroforesis a 110 v constantes, con dimensiones del gel de aproximadamente 8 x 8 cm.

Determinada la integridad del ácido nucléico se prosiguió a su purificación utilizando el protocolo DNA Gel Extraction Kit (MILLIPORE). Se corta del gel de agarosa la o las bandas de DNA de interés con la ayuda de un transiluminador de UV y una navaja de un filo nueva. El fragmento de agarosa se coloca en la columna de purificación. Se centrifugó 10 min a 5000 rpm y en el sobrenadante resultante se encuentra el inserto purificado.

### **Restricción del DNA**

Después de determinar la integridad del DNA y purificarlo, se digirió con la enzima de restricción Hind III, considerando que esta enzima no corta el gen que codifica para la AOX de acuerdo con el mapa de restricción (Se obtuvo de <http://www.vivo.colostate.edu/mapper/index.html>). La selección de esta enzima se realizó considerando principalmente a que esta estuviera disponible en el laboratorio.

En un tubo estéril se colocaron 40  $\mu$ L de DNA purificado, 1  $\mu$ L de Hind III, 4  $\mu$ L de agua estéril y 5  $\mu$ L de Reactivo 3 10X. Esta mezcla se incubó a 37° C alrededor de 15 h. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, para determinar su correcto fraccionamiento.

*Despurinación parcial, desnaturalización y neutralización del gel de agarosa que contiene el DNA restringido.*

Se lavó el gel que contiene las reacciones de digestión, en una solución 0.25 M de HCl con agitación suave constante (150 rpm) por 15 min dos veces. Se realizó un segundo lavado con una solución que contiene NaCl 1.5 M y NaOH 0.5 M con agitación suave constante por 15 min dos veces. Se le realizó un tercer lavado con una solución que contiene NaCl 1.5 M y Tris-HCl 1 M pH 8.0 con agitación suave constante (150 rpm) por 20 min. Se realizó un cuarto lavado con una solución SSC 10x con agitación suave constante (150 rpm) por 20 min.

La transferencia por capilaridad a membrana de nylon, la prehibridación, la hibridación y la exposición se realizaron de manera similar como se realizó en la hibridación tipo Northern Blotting.

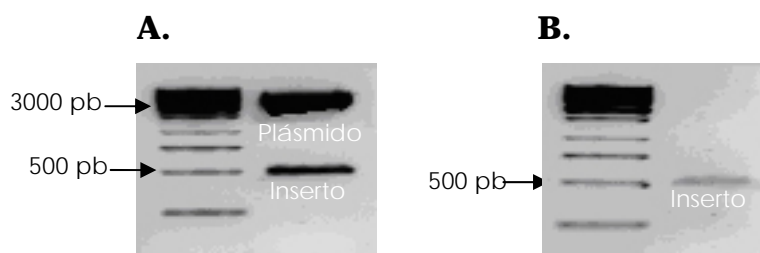
# RESULTADOS

---

---

## Obtención de la sonda específica para la AOX

Para detectar la posible transgénesis de las plantas de tabaco y analizar el efecto del estrés hídrico sobre la expresión génica de la AOX, se requirió de una sonda específica para esta enzima. Esta se obtuvo clonando un fragmento de 500 pb conteniendo una porción del marco de lectura de la proteína, y con una homología del 75 % a nivel de DNA con la AOX de tabaco del vector (pPCR-Script Amp, stratagene; apéndice A). Después de varios ciclos de selección fenotípica y purificación de las clonas celulares transformadas se liberó el inserto mediante enzimas de restricción específicas (EcoR1 y Not1). Una vez liberado el inserto se prosiguió a su purificación; el resultado de estas manipulaciones se ilustra en la figura 8



**Figura 8.** Purificación del inserto. **A.** Plásmido recombinante digerido con enzimas de restricción (EcoR1 y Not1). **B.** Inserto de AOX purificado.

El peso molecular del plásmido y del inserto liberado están de acuerdo a lo esperado (inciso A, figura 8). El fragmento de AOX purificado también muestra el peso molecular esperado (inciso B, figura 8). Este fragmento se utilizó como sonda para todos los experimentos que posteriormente se describen.

El inserto se marcó radiactivamente con  $[\alpha\text{-}^{32}\text{p}]\text{-}\delta\text{CTP}$ . La tabla 1 muestra la actividad específica de la sonda. Debido al número de muestras tratadas, el experimento se realizó en dos etapas y por tanto la sonda se marcó en dos experimentos independientes.

**Tabla 1.** Cuantificación de la sonda específica para la AOx en diferentes experimentos.  
**A.** Porcentaje de marca radiactiva incorporada al inserto

<b>Experimento</b>	<b>Actividad Específica cpm/<math>\mu</math>g de la sonda</b>	<b>Rendimiento<sup>A</sup></b>
RNA de tabaco y maíz	1.11 X 10 <sup>7</sup>	70.69%
DNA de tabaco y maíz	2.55 X 10 <sup>7</sup>	38.00%

La primera columna muestra en que experimentos se empleó cada marcaje, la segunda columna muestra la actividad específica de la sonda y la tercera el porcentaje de la radiactividad incorporada. Se puede observar que en ambos experimentos la radiactividad específica de la sonda fue similar, y del orden de la recomendada para este tipo de experimentos (protocolo de Nick Translation Kit, Amersham Biosciences)

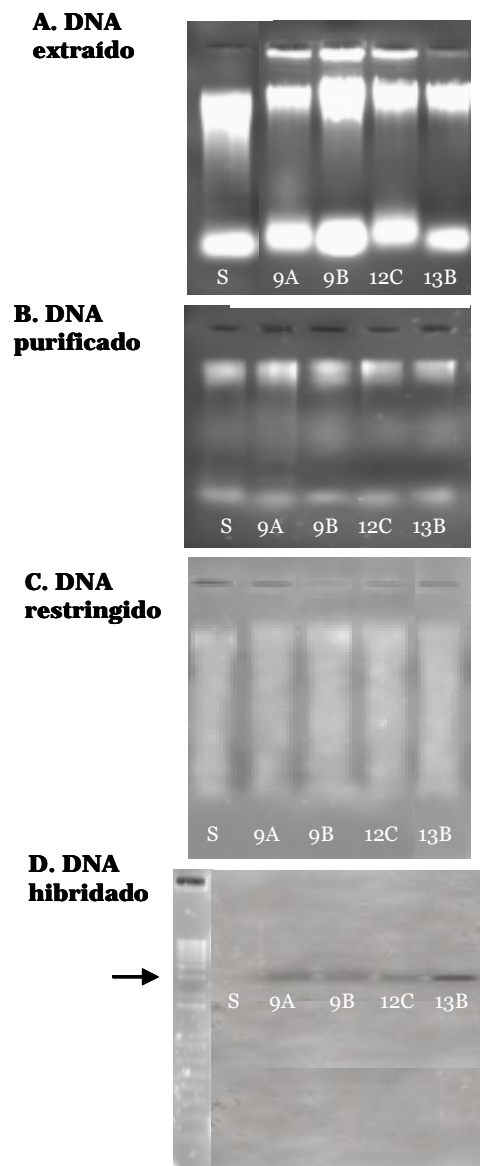
### **Transgénesis de los diferentes lotes de *Nicotiana tabacum***

La figura 9 inciso A muestra la extracción del DNA genómico aislado de plántulas de tabaco modificadas con una construcción conteniendo el gene para la AOx. Esta extracción se realizó de manera exitosa debido a la fuerte intensidad de las bandas, lo que nos sugiere una abundancia en cantidad de este ácido nucleico.

Debido a que el DNA comprende un amplio rango de pesos moleculares, es muy probable que contenga RNA y otras impurezas (proteínas y sales) que podrían disminuir la actividad de las enzimas de restricción y su efectividad en la digestión del nucleico. El inciso B de la figura 9 se muestra la purificación del DNA.

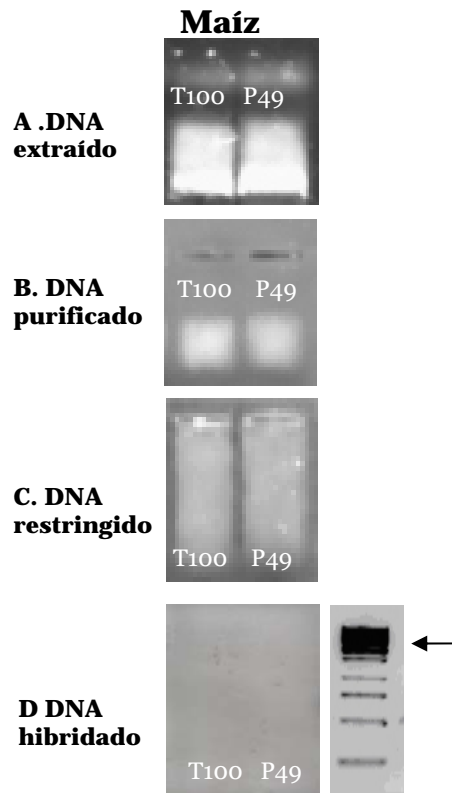
El inciso C de la misma figura muestra el DNA de tabaco después de haber sido restringido por la acción de la enzima Hind III observándose el barrido de ácido nucleico característico de una buena restricción. Esta modificación del DNA es necesaria para generar fragmentos de DNA de diversos pesos moleculares que van de aproximadamente 10 000 pb hasta 200 pb. Esta enzima fue seleccionada porque el gene de AOx en maíz no contiene este sitio de restricción y se hipotetizó que tampoco estaría en tabaco (el gen para la AOx de tabaco no ha sido reportado). Con lo cual el número de bandas de hibridación se interpretó como el número de copias para el gene AOx. En este paso se confirmó por espectrofotometría que la cantidad de DNA restringido fue de 20  $\mu$ g por muestra (datos no mostrados).





**Figura 9.** Análisis del DNA de diferentes lotes transformados de *Nicotiana tabacum* (9A, 9B, 12C y 13B) y uno sin transformar (S).

Experimentos similares, se realizaron con dos cultivares de maíz T100 y P49. Los resultados obtenidos con estos materiales fueron similares a los obtenidos con tabaco (figura 10).

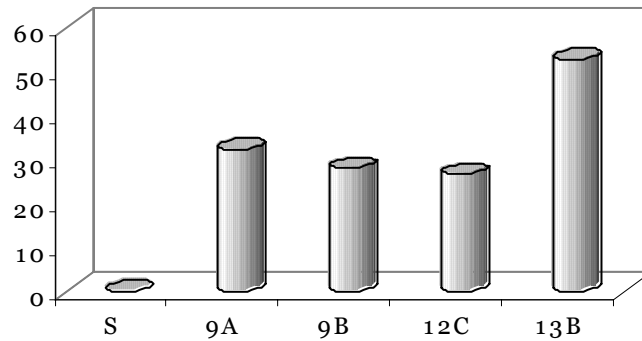


**Figura 10.** Análisis del DNA de dos lotes silvestres de *Zea mays*

En el inciso D de las figuras 9 y 10 observamos que para las muestras de tabaco 9A, 9B, 12C y 13B hay una banda definida para cada una de ellas entre 4000 y 3500 pb aproximadamente que corresponde al tamaño del gene de la AOX reportado en otras especies.

En el caso de las plantas transformadas de tabaco se esperaba que contengan un número mayor de copias de AOX que él presente en la planta silvestre.

Para complementar la caracterización de estas plantas se cuantificó la señal de hibridación por densitometría (figura 11). En el caso del tabaco, la intensidad de la señal de hibridación en las plantas transgénicas fue mayor que en la silvestre. Y entre las transgénicas el 13 B fue la que mostró mayor intensidad. Sin embargo, para el caso de la planta silvestre de tabaco y los dos lotes de maíz el gene no pudo ser detectado.



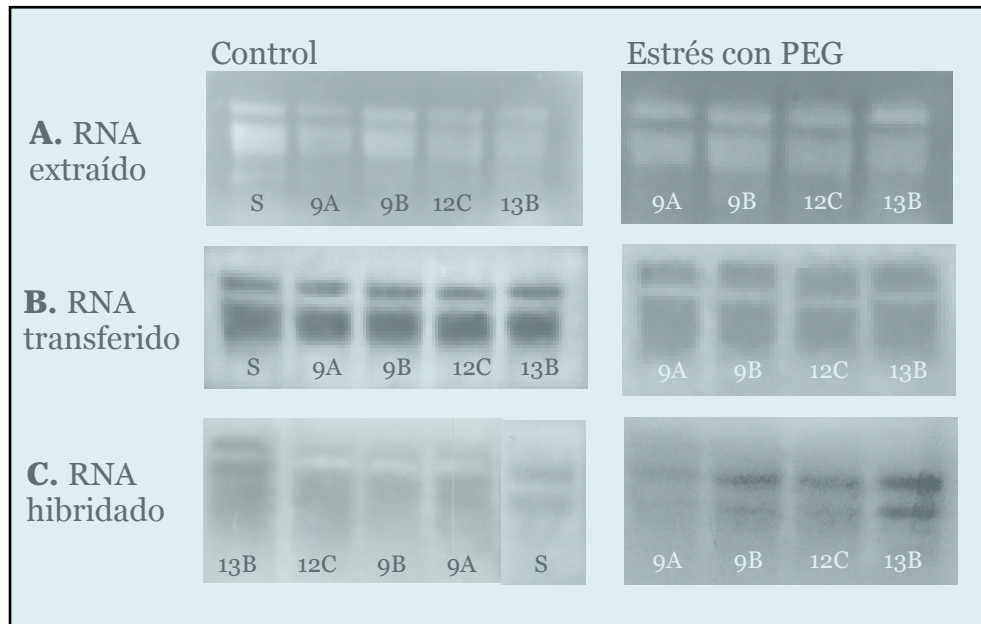
**Figura 11.** Análisis densitométrico del fragmento que codifica para la enzima AOX en planta silvestre (s) y en plantas transformadas de *Nicotiana tabacum*.

### **Expresión génica de la AOX en plantas transformadas de *Nicotiana tabacum* bajo estrés.**

Mediante una hibridación tipo northern blot, se observó una expresión diferencial del gen que codifica para la enzima AOX en la planta silvestre y las líneas transformadas de tabaco (figura 12).

Se determinó que para cada una de las muestras de tabaco el aislamiento fue el adecuado sin contaminación aparente de DNA y proteínas (bandas de nucleicos de PM no mayor que los RNAr y  $A_{260} / A_{280} > 1.8$ ). La integridad del RNA total se confirmó al observar bandas definidas y no manchas o múltiples bandas que indican la degradación de este nucleico (figura 12, inciso A).

Debido a que el RNA fue obtenido de tejido verde la complejidad de los nucleicos observada en la figura 12 se debe a la presencia de rRNA de citoplasma y de cloroplastos. Sin embargo, se puede observar que en ninguno de los casos se observo nucleicos de menor peso molecular que el 16 S. De acuerdo con los datos anteriores, el RNA total aislado de las muestras reunió las características deseadas para ser transferido a una membrana de nylon. Para evaluar la eficiencia de este paso, la membrana se tiñó con azul de metileno (figura 12, inciso B).

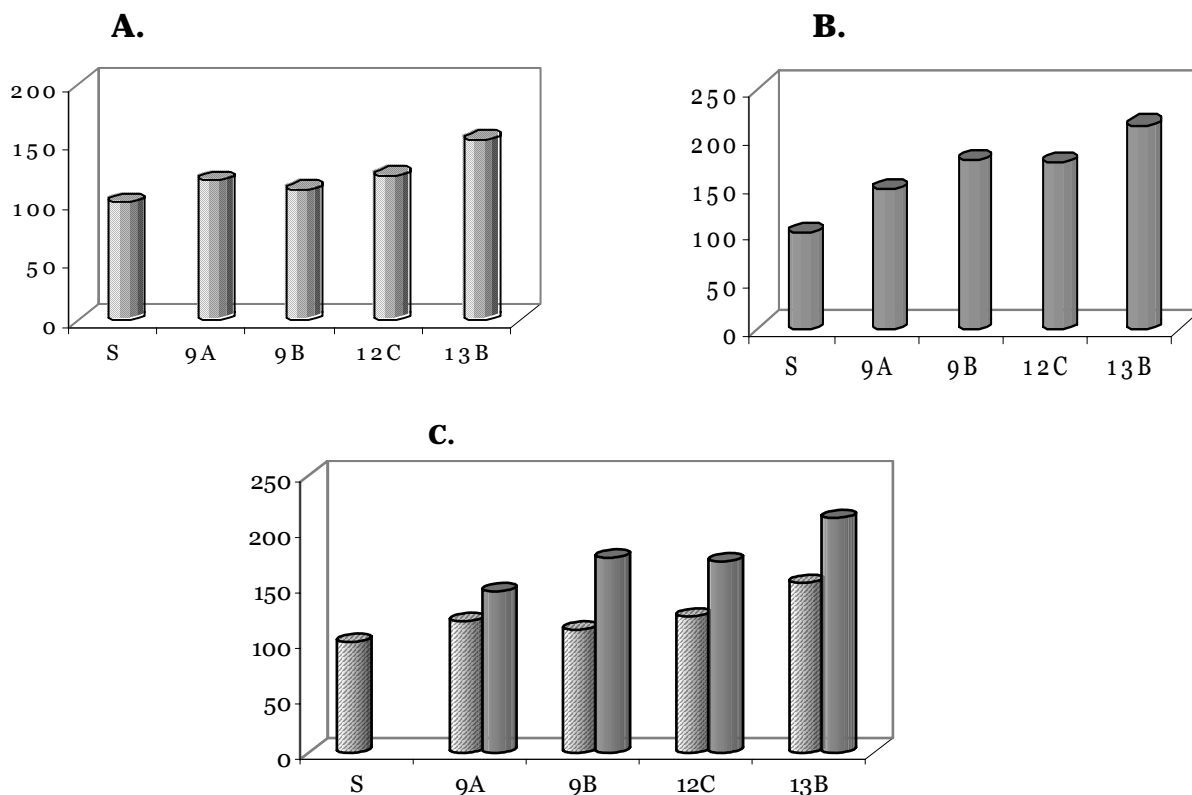


**Figura 12.** Hibridación tipo Northern Blotting de *Nicotiana tabacum* sin estrés y en condiciones de estrés.

Se realizó un análisis densitométrico (resultados que no se muestran) de la intensidad de las bandas del RNA total en la membrana de nylon para determinar si existen o no diferencias en concentración del nucleico, determinándose que no existen tales diferencias entre las muestras.

En el inciso C de la figura 12 podemos observar las diferencias de expresión del gen de la AOX en condiciones de estrés y sin estrés

Para poder determinar cual es la diferencia en el nivel de expresión del gene entre las muestras se realizó un análisis densitométrico que se muestra en la figura 13.



**Figura 13.** Análisis densitométrico de la expresión diferencial de la AOX en crecimiento A. sin estrés, B. con estrés y C. una comparación entre estas dos condiciones

Se consideró la expresión de la AOX en la planta silvestre en crecimiento sin estrés (control) como el 100 %. Con base en ello se estimó que hay un aumento moderado (53%) para la línea transformada 13B y para las líneas transformadas 9A, 9B y 12 C existe un aumento discreto (19%, 11% y 23%) respectivamente (figura 13, inciso A).

Bajo condiciones de estrés por PEG observamos que existe un aumento moderado (46%) para la línea transformada 9A respecto a la silvestre, un aumento elevado para las líneas 9B y 12C (76 y 73% respectivamente) y un aumento considerable (225%) de la línea transformada 13B (figura 13, inciso B).

Al comparar la expresión de la AOX entre condiciones de crecimiento sin estrés y con estrés se determinó que la línea 9A aumenta su expresión en un 27% cuando se encuentra en estrés, la línea 9B la aumenta en un 65%, la línea 12 C la aumenta en un 50% y la línea 13 B la aumenta en un 59% cuando se encuentran en la misma condición de estrés.

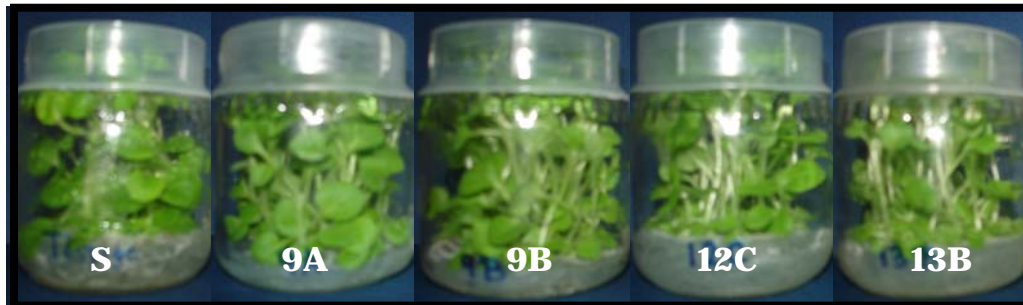
Una vez que se corroboró la transgénesis de las plantas de tabaco se procedió a determinar la tolerancia fisiológica de estos materiales al estrés y conocer si existe modificación en estas características asociadas con la expresión del transgen.

En el tabaco (figura 14, inciso A), la transgénesis no modificó el patrón de desarrollo de las diversas líneas, ni existe algún cambio morfológico aparente entre ellas. En general, las plantas transgénicas fueron mas tolerantes al estrés que las control (comparar figura 14:A vs figura 14:B).

En condiciones de estrés, cada transgénica presentó diferente tasa de crecimiento. En planta completa se observó que la transgénica 9A creció más que la planta control pero mucho menos que las otras líneas transgénicas. Sin embargo, algunas de las hojas de la 9A, al momento de compararlas, crecieron tan poco como las control (figura 15).

Por el contrario, el patrón de crecimiento en condiciones de estrés de las otras transgénicas, fue similar tanto en hoja como en planta completa. Las plantas de tabaco que mejor crecieron en estrés fueron las 12C seguidas de las 13B y por último las 9B.

A. Crecimiento sin estrés



B. Crecimiento con estrés (con PEG)



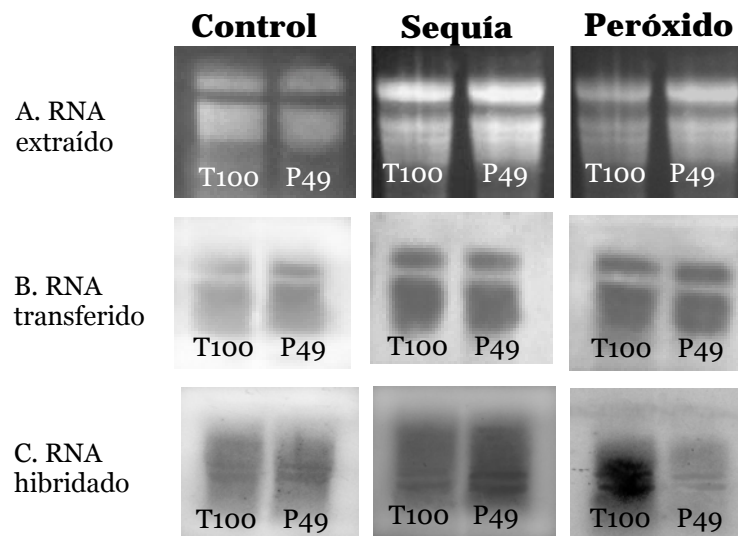
**Figura 14.** Diferencias morfológicas entre plantas cultivadas de *Nicotiana tabacum* en A. crecimiento normal y B. en condiciones de estrés con PEG



**Figura 15.** Diferencias morfológicas en hojas entre plantas cultivadas de *Nicotiana tabacum* en **1.** condición de estrés con PEG (hojas de lado izquierdo) y **2.** crecimiento normal (hojas de lado derecho)

### Expresión génica de la AOx en *Zea mays*

El maíz fue estresado por falta de riego y por adición de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). A través una hibridación tipo northern, se observó una expresión diferencial del gen que codifica para la enzima AOx en los dos lotes de *Zea mays* T100 y P 49 (figura 16).

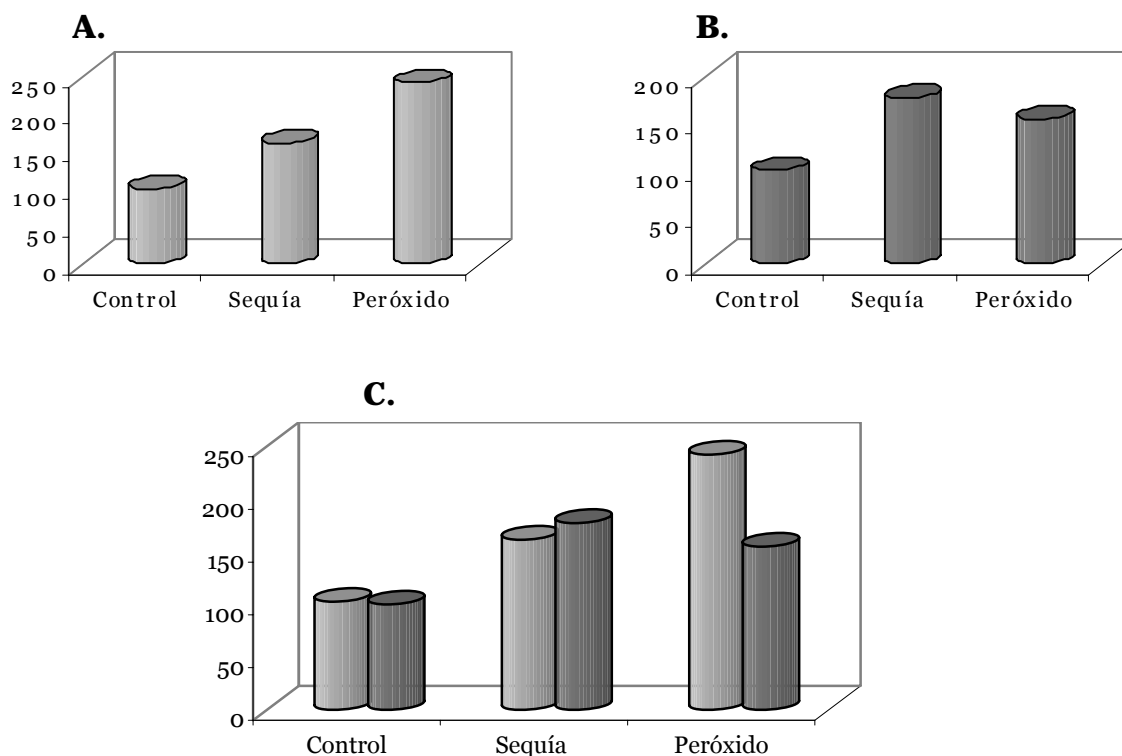


**Figura 16.** Hibridación tipo Northern blotting de RNA total de *Zea mays* lote T100 y P49. en condiciones normales de crecimiento, sequía y en estrés por peróxido de hidrógeno. A. Integridad del RNA total, B. RNA transferido a una membrana de nylon y C. RNA total hibridado con una sonda específica para la AOx.

La integridad y pureza del RNA total se confirmó al observar bandas definidas, la diferencia de intensidades se debe al empleo de cantidad diferente de muestra sólo para verificar la integridad (figura 16, inciso A). En el inciso B de esta misma figura se muestra la transferencia del RNA total de los diferentes lotes de maíz a los cuales se les realizó un análisis densitométrico para determinar si existe diferencias de concentración. Este análisis nos indicó que si existe diferencia entre

las muestras T100 control y P49 control, siendo la concentración de la muestra T100 ligeramente menor.

Al realizar un análisis densitométrico de la expresión de la AOX en T100 y P49, considerando esta expresión de cada especie en condiciones normales de crecimiento, como el 100%. Se encontró que existe un aumento moderado en la expresión de la enzima (61%) en el caso de estrés por sequía y pronunciado (147%) en el caso de un estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, para la especie T100 (figura 17, inciso A). Para la especie de P49 se encontró que existe un aumento moderado en la expresión tanto para el caso de estrés por sequía (77%) como para el caso de estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (55%); figura 17, inciso B.



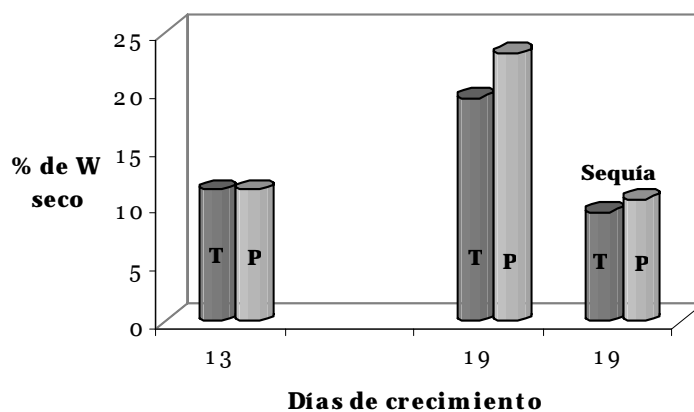
**Figura 17.** Análisis densitométrico de la expresión de la enzima AOX en *Zea mays* **A.** Tepecintle 100 (T100), **B.** Pepitilla 49 (P49) y **C.** una comparación entre ambas en diferentes tipos de estrés.

Al comparar entre ambas especies (figura 17, inciso C) se determinó que existe mayor abundancia en la expresión (16%) en P49 cuando hay estrés por sequía, sin embargo cuando existe un estrés por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hay mayor abundancia de la expresión (87%) en T100 comparado con P49.



Para determinar el efecto del estrés hídrico sobre el desarrollo de las plantas de maíz se realizó un experimento de peso seco durante un estado de sequía por cinco días sobre la planta (figura 18).

El estrés disminuyó la tasa de crecimiento de las plántulas de maíz. Al cabo de trece días de crecimiento en condiciones óptimas ambos lotes (T100 y P49) presentan el mismo desarrollo; al cabo de 19 días de crecimiento la acumulación de peso seco fue mayor (4%) en P49 que en T100. Sin embargo cuando ambos cultivares son sometidos a estrés hídrico su desarrollo fue similar (< 1%).



**Figura 18.** Peso seco en plantas *Zea mays* lotes T100 y P49 en condiciones normales y condiciones de estrés por sequía

# DISCUSIÓN DE RESULTADOS

---

---

Previo a los experimentos aquí presentados se seleccionaron semillas transgénicas germinándolas en medio selectivo, las plantas se autopolinizaron por dos generaciones para obtener plantas homocigas. Los resultados en la figura 9 demuestran que las plantas provenientes de estas semillas de tabaco son transgénicas y que el gene de la AOX se encuentra en diferentes dosis. Estas afirmaciones se apoyan en el hecho de que el DNA genómico de las plantas transformadas de tabaco híbrido con una sonda específica para la AOX. El peso molecular de la señal de hibridación fue de aproximadamente entre 4000 y 3500 pb, y su intensidad fue diferente para cada transgénica (Figura 9). El número de copias del gene AOX presente en las plantas transgénicas respecto del control no pudo ser calculado porque no se detectó señal en las planta silvestre, debido quizá a la poca cantidad de DNA utilizado. Los experimentos no pudieron ser repetidos con mayor cantidad de DNA por la limitación en la fuente del DNA. Aparentemente, a mayor dosis del gene de oxidasa alterna, mayor la tolerancia al estrés hídrico, puesto que el desarrollo presentó menor inhibición en las transgénicas 12C y 13B, las cuales presentaron la mayor cantidad del transgene (Figura 14). Este incremento en tolerancia al estrés podría deberse al hecho de que el gene de AOX introducido se integró en alguna zona del genoma que le permitió expresarse de forma tal que la cantidad de AOX fuese también diferente en cada caso y por tanto aún cuando estuviera en estrés, la cantidad de derivados tóxicos de oxígeno fuese menor. Efectivamente, los niveles de expresión de la AOX fueron mayores en las plantas con mayor cantidad del transgene (figura 13). Asimismo, la actividad de la enzima, cuantificada en semillas transgénicas germinadas, fue mayor que en las silvestres (datos no mostrados). Las dos señales detectadas en el RNA de las plantas de tabaco silvestres sugieren la presencia de dos transcritos uno de los cuales podría ser el producto de degradación o bien dos transcritos provenientes de dos genes o provenientes de un gene con procesamiento alternativo. El hecho de que algo similar se observe en las plantas transgénicas sugiere que uno de los

transcritos proviene de la degradación del otro. Para demostrar que efectivamente la AOX proveniente del transgene es funcional, se requiere cuantificar la actividad de la oxidasa alterna además de la producción de radical superóxido en mitocondrias aisladas de plantas transgénicas y de silvestres. Sin embargo, el hecho de que el crecimiento de las plantas transgénicas sea menor que el de plantas silvestres, sugiere que el estrés afecta otros procesos independientes de los que pudiesen ser afectados por los derivados tóxicos de oxígeno.

En maíz, al igual que en tabaco, el cultivar con mayor capacidad para expresar el gene de la AOX durante el estrés hídrico (figura 16), T100, presentó mayor tolerancia a dicho estrés (figura 18). Esta capacidad también se expresó cuando la hoja se retó con  $H_2O_2$  una de las sustancias tóxicas de oxígeno que suelen acumularse durante el estrés en plantas de baja tolerancia al estrés, sugiriendo que el gene es inducible por peróxido de hidrógeno.

# CONCLUSIONES

---

---

Tanto los objetivos particulares como el general fueron cumplidos y los resultados de los experimentos demuestran que plantas con una mayor capacidad de expresión del gene de la oxidasa alterna incrementan su tolerancia al estrés. Esta mayor capacidad puede ser adquirida (plantas transgénicas de tabaco) o natural (maíz).

# BIBLIOGRAFÍA

---

---

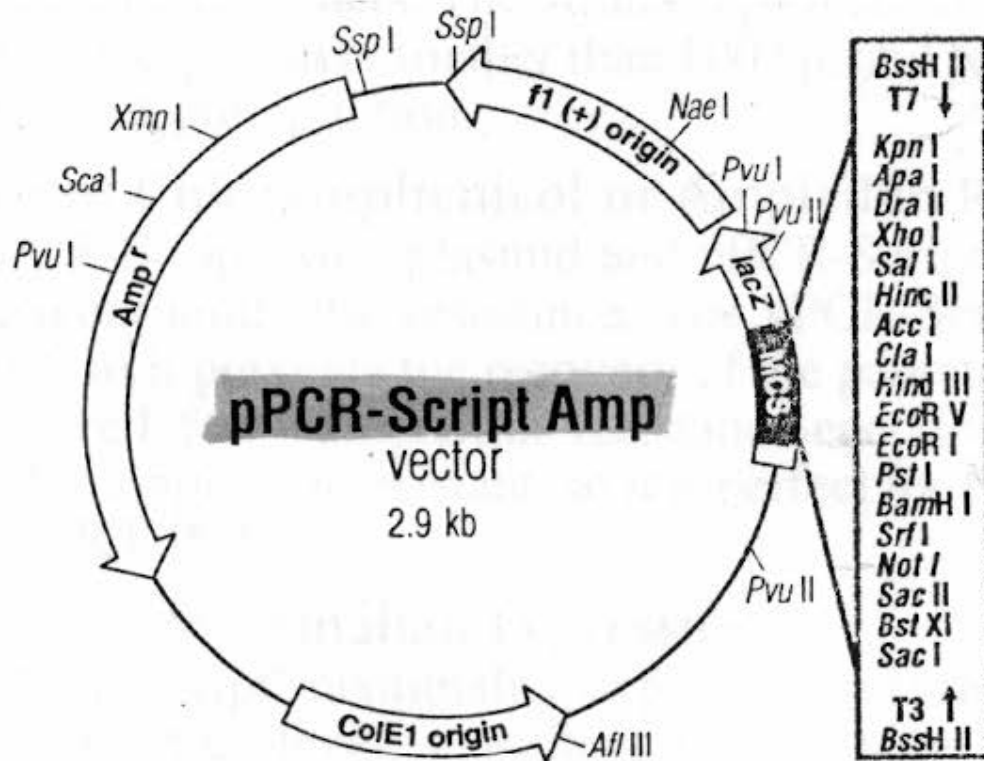
- Allen R D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiology* (1995), 107:1049-1054.
- Alonso-S. V. J. Funcionalidad respiratoria de la mitocondria y su relación con el envejecimiento de semillas de maíz. Tesis de Licenciatura, UNAM, (2003).
- Apel K, Hirt H. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress, And Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* (2004), 55: 373–99.
- Asada K. THE water-water cycle in cloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.* (1999), 50: 3601–639.
- Bartoli C G, Gómez F, Martínez D E y Guiamet J J. Mitochondria are the main target for oxidative damage in leaves of wheat (*Triticum aestivum L.*). *Journal of Experimental Botany* (2004) , 55:1663-1669.
- Buchanan B, Wruissem R W. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants.* Jones, Eds. American Society of Plant Physiologists (2000), Cap. 22.
- Carrillo N, Valle E M. El lado oscuro del Oxígeno. Sociedad Argentina de Fisiología Vegetal, 2005 (en línea, disponible en <http://www.safv.com.ar/archivosafv.htm>; internet; accesado el 25 de marzo del 2006).
- Cruz-Hernández, Gómez-Lim. Alternative oxidase from mango (*Mangifera indica, L.*) is differentially regulated during fruit ripening. *Planta* (1995), 197: 569-576.
- Day D A, Wiskich J T. Regulation of alternative oxidase activity in higher plants. *J. Bioenerg. Biomembr* (1995), 27. 379-85.
- Finnegan P M, Wooding A R, Day D A. An alternative oxidase monoclonal antibody recognises a highly conserved sequence among alternative oxidase subunits. *FEBS Letters* (1999), 447: 21-24.
- Fridovich I. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol* (1998), 201:1203-1209.

- Foyer C H, Descourvieres P y Kunert K J. Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plant. *Plant, cell and environment* (1994), 17: 507-523.
- Guzmán-Can P. A., La Oxidasa Alternativa de mitocondrias de *Euglena gracilis*. Tesis de Licenciatura, UNAM (1996).
- Huberman A. Biología de los radicales de oxígeno. *Bioquímica Especial*, p. 715-723.
- Lehninger A.L., Nelson D.L., Cox M.M. Principios de Bioquímica. Ediciones Omega S.A. 2ª Edición. Barcelona (1993).
- Luque J, Herráez A. Biología Molecular e Ingeniería Genética. Ed. Harcourt. Madrid, España (2001), Cap 1, 7, 13, 14, 16.
- Maarten J C, Sadava D E. Plants, Genes and Crop Biotechnology. Ed. Jones and Bartlett, United States of America (2003). Cap 6.
- Martínez-Silva AV. Clonación de genes inducidos durante la germinación del maíz. Tesis de Maestría, UNAM (2006).
- Maxwell D.P., Wang Y, McIntosh L. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999), 96: 8271-8276.
- Maxwell D P, Nickels R, McIntosh L. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant J.* (2002), 29: 269-279.
- Millar A H, Day D A. Nitric oxide inhibits the cytochrome oxidase but not the alternative oxidase of plant mitochondria. *FEBS Lett.* (1996), 398: 155-158.
- Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* (2002), 7: 405–410.
- Moore A L, Siedow J N. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of the plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* (1991), 1059: 121-140.
- Pérez-Pérez L M. Estrés Oxidativo: La Paradoja Del Oxígeno. *Rev Cubana Endocrinol* (2000), 11:139-42.
- Plant physiology on line: the alternative oxidase chapter 11 topic 11.3 <http://3e.plantphys.net/article.php?ch=t&id=148> internet; accesado el 24 de marzo del 2006).

- Polidoros A N., Mylona P V, Pasentsis Konstantinos, Scandalios J G, Tsaftaris A S. The Maite alternative oxidase 1<sup>a</sup> (AOx1a) gene is regulated by signals related to oxidative stress. *Redox Report* (2005), 10. No 2.
- Ríos de Molina. El estrés oxidativo y el destino celular. Departamento de Química Biológica. FCEyN, UBA; 2003 (en línea, disponible en <http://www.quimicaviva.qb.fcen.uba.ar/Actualizaciones/estres%20oxidativo.htm>; internet; accesado el 26 de marzo del 2006).
- Rodríguez C, Hamabata A. Generalidades sobre la bioquímica del estrés oxidativo en plantas. *BEB* (2001), 4: 254-263.
- Simontachi M, Galato A, Pantarulo S. El estrés oxidativo en plantas. *Revista Ciencia Hoy* en línea. Vol. 10 (2000), (en línea, disponible en <http://www.ciencia-hoy.retina.ar/In/hoy60/estresoxidativo.htm>; internet; accesado el 13 de marzo del 2006).
- Sorribas V. Los radicales libres. *Revista Química Viva* en línea. Vol. 2 (2003), (en línea, disponible en <http://www.ecoaldea.com/articulos/radicales.htm>; internet; accesado el 13 de marzo del 2006).
- Sierra-Campos, Villavicencio-Queijeiro, Velásquez I, Pardo J P. Activación y función de la Oxidasa Alternativa mitocondrial de *Ustilago maydis*. Depto. de Bioquímica, Fac. de Medicina. UNAM. México (2005).
- Umbach A L, Siedow J N. Covalent and noncovalent dimers of the cyanide-resistant alternative oxidase protein in higher plant mitochondria and their relationship to enzyme activity. *Plant Physiol.* (1993), 103: 845-854.
- Umbach A L, Fiorani F, Siedow J N. Caracterización de transformados de *Arabidopsis* con alterados niveles de oxidasa alternativa y análisis de efectos sobre especies reactivas de oxígeno en tejido. *Plant Physiol.* (2005), 139: 1806-1820.
- Umbach A L, Wiskick J T, Siedow J N. Regulación de la cinética de la oxidasa alternativa por piruvato y estado redox del enlace de disulfuro intermolecular en plántulas de soja. *FEBS Lett* (1994), 348: 181-184.
- Voet D, Voet J. *Biochemistry*. John Wiley & sons inc. 2<sup>a</sup> Edición. USA (1995), Cap. 27.
- Zimmers-Koniaris. Northern Blotting and RNA Detection. *Encyclopedia of Life Sciences* (2001).

# APÉNDICE A

Diagrama del vector de clonación pPCR-Script Amp (stratagene)





# APÉNDICE B

---

---

*En esta sección se describen los conceptos teóricos en los que se basan los métodos utilizados para el desarrollo experimental de este trabajo.*

## **Ácidos Nucléicos: ADN y ARN**

Existen dos tipos de ácidos nucleicos (Figura A-1): el **ADN** (ácido desoxirribonucleico) y el **ARN** (ácido ribonucleico).

Ambos nucleicos están constituidos por la unión de numerosos monómeros (molécula simple capaz de combinarse consigo misma o con otras similares para formar un polímero). Los monómeros de los ácidos nucleicos son los nucleótidos (Figura A-1). Un nucleótido consta de un grupo fosfato (residuo de ácido fosfórico) y un nucleósido. Un nucleósido está compuesto a su vez por una base nitrogenada y un azúcar.

La base nitrogenada o nucleobases son las portadoras de la información genética; desde el punto de vista químico, pueden ser de dos tipos: pirimidicas como la Citosina, Timina y Uracilo (sólo se encuentra presente en el RNA) y purínicas (como la Adenina y Guanina).

La base nitrogenada y el azúcar están unidos por un enlace glucosídico (enlace covalente). Dado que el azúcar se une a un nitrógeno el enlace recibe el nombre de *N*- glucosídico. Este enlace se forma entre el carbono C-1' del azúcar y el nitrógeno N-1 si la base es una pirimidina o en el nitrógeno N-9 si la base es una purina. Los átomos del azúcar se marcan como primos para diferenciarlos de los átomos de la base.

Si el azúcar es una ribosa, el compuesto resultante es un ribonucleótido; si el azúcar es una desoxirribosa el compuesto resultante es un desoxirribonucleótido.

Por otro lado, cuando se esterifica el residuo del ácido fosfórico (grupo fosfato) con uno de los grupos hidroxilo del azúcar de un nucleósido, se forma un nucleótido. El nucleótido formado deriva su nombre del nucleósido progenitor. La

posición del éster fosfato se especifica por el número del átomo de carbono al que estaba unido el grupo hidroxilo con el que se esterificó el residuo del ácido fosfórico

El enlace que une a los monómeros de los ácidos nucleicos implica la formación de un enlace anhídrido entre dos enlaces de ácido fosfórico, los unidos a los carbonos 3' y 5' de residuos adyacentes. EL enlace covalente que resulta es denominado enlace fosfodiéster 3',5'

Los residuos de nucleótidos de los ácidos nucleicos se numeran a partir del extremo 5' (extremo que tiene un grupo fosfato) al extremo 3' (extremo que tiene un grupo hidroxilo libre) (Campbell, 2004).

Tipo de Ácido nucleico				ADN: Acido desoxirribonucleico	RNA: Acido ribonucleico
Nucleótido (monómero)	Fosfato			Residuo de ácido fosfórico	
	Nucleósido	Azúcar		2'-Desoxirribosa	Ribosa
		Base nitrogenada	Pirimidinas	Citosina	
			Purinas	Timina	Uracilo
				Adenina	Guanina

**Figura A-1** Tipos de ácidos nucleicos según su composición (modificado de Luque y Herráez, 2001).

### **Niveles estructurales de los ácidos nucleicos**

Desde el punto de vista estructural, en los ácidos nucleicos pueden considerarse varios niveles:

- Estructura primaria es el orden de las bases en un polinucleótido. Define la secuencia del ácido nucleico.
- Estructura secundaria es la conformación tridimensional del esqueleto. Para el DNA este nivel esta definido por la asociación de dos cadenas polinucleótidas. En el RNA sólo se presenta en determinadas regiones de la molécula.
- Estructura terciario o de orden superior es la estructura que surge a partir de los niveles primario y secundario. Aquí también se incluyen las estructuras resultantes del superenrollamiento del DNA y la asociación de los ácidos nucleicos con proteínas.

## **Algunas propiedades fisicoquímicas de los ácidos nucleicos**

Las cadenas polinucleótidas de DNA y RNA son hidrofílicas debido a la posibilidad de formación de enlaces de hidrógeno con el agua por parte de los grupos fosfato e hidroxilo libres.

Los ácidos nucleicos son químicamente muy estables, en el caso del DNA por que carece de un grupo reactivo hidroxilo 4'-OH. En el caso del RNA es más reactivo por que tiene grupos 2'-OH reactivos (Luque, Herráez; 2001)

Al estar en presencia de ácidos fuertes el ADN y el RNA se hidrolizan, lo que nos sirve para analizar la composición de un ácido nucleico pero no su secuencia. En cambio, en medio alcalino el RNA se hidroliza rápidamente, liberando sus nucleótidos, pero el DNA no se hidroliza.

Las distintas bases que conforman a los ácidos nucleicos absorben en el ultravioleta a una misma longitud de onda  $A_{260}$ . Esta característica se utiliza para detectar y cuantificar los ácidos nucleicos (procedimiento comúnmente utilizado). Si se realiza este método de cuantificación se recomienda realizar una segunda medición de la absorción de la muestra a una  $A_{280}$  para detectar la posible contaminación con proteínas y corregir la interferencia.

## **Tipos de RNA**

Existen tres tipos principales de RNA: mensajero (mRNA), de transferencia (tRNA) y ribosómico (rRNA). Todos ellos tienen en común una función relacionada con la expresión génica.

- RNA mensajero

Transfiere el mensaje genético desde el núcleo al citoplasma y posteriormente actúa en el ribosoma como molde para la síntesis proteica. Constituye cuando más del 5-10% del RNA total.

- RNA de transferencia

Actúan como moléculas adaptadoras en la síntesis de proteínas. Es el mediador entre el mensaje del mRNA y la secuencia de aminoácidos del polipéptido que se está sintetizando. Esta función depende de una doble interacción:

- Por un extremo de su estructura se unen al aminoácido para dar aminoacil-tRNA.

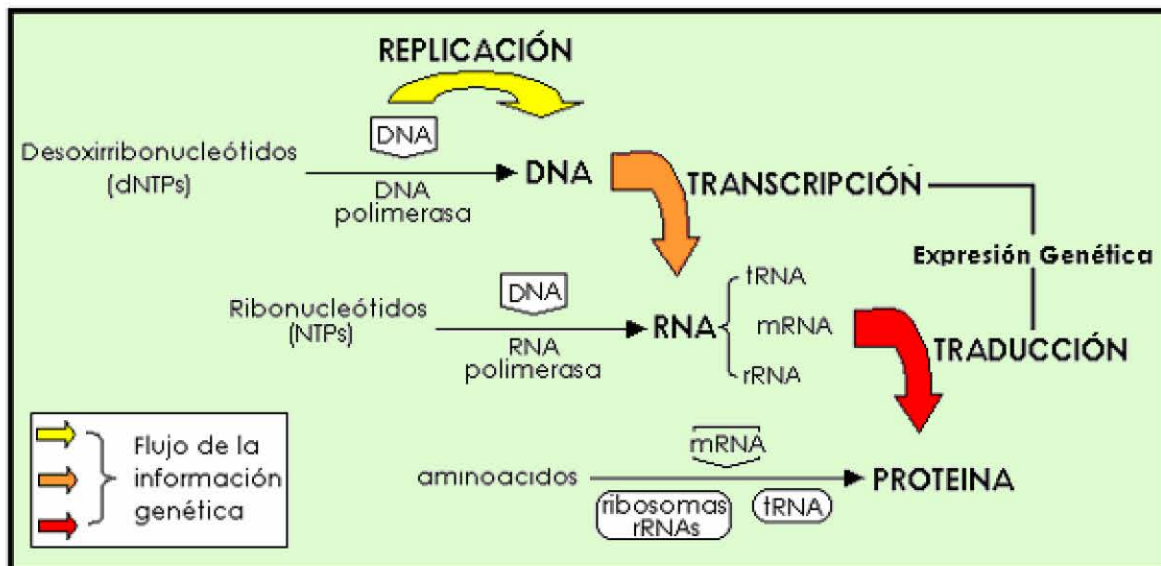
- Por el otro extremo se une con el mRNA en presencia del ribosoma, transfiriendo el aminoácido al péptido creciente (Campbell, 2004)

Se pueden hallar diferentes moléculas de tRNA por que al menos un tRNA se une en una forma específica a cada uno de los aminoácidos que componen a las proteínas (Luque, Herráez; 2001).

- RNA ribosómico

Es el soporte estructural y el componente principal de los ribosomas. Constituyen la mayor parte del RNA total, alrededor del 75% del RNA total (Campbell, 2004)

## Transmisión de la información genética



**Figura A-2.** Esquematización del flujo de la información genética (modificado de Luque y Herráez, 2001).

La información genética contenida en la secuencia del DNA se transmite a las células y organismos descendientes mediante la replicación y su expresión en biomoléculas funcionales, por los procesos de transcripción y traducción (Fig. 9; Luque, Herráez; 2001).

**Replicación.** Es la duplicación del DNA cromosómico progenitor para producir una nueva molécula de DNA con la misma secuencia de bases del original. Esta duplicación es necesaria cada vez que una célula se divide para dar origen a las

células hijas con DNA idéntico al de su progenitor (Campbell, 2004 y Luque, Herráez; 2001).

**Transcripción.** Proceso mediante el cual se sintetiza una cadena de RNA a partir de la información genética contenida en la región codificante de un DNA. La cadena de RNA que se produce no tiene la secuencia idéntica del DNA molde a partir del cual se sintetizó, sino que es complementaria y antiparalela a ella (Luque, Herráez; 2001)

**Traducción.** Consiste en la síntesis de proteínas mediante la unión de aminoácidos según el orden establecido por la secuencia de nucleótidos del mRNA y el código genético.

### **Expresión Génica**

La expresión génica es el proceso por medio del cual todos los organismos procariotas y eucariotas transforman la información codificada en los ácidos nucleicos en las proteínas necesarias para su desarrollo y funcionamiento. En todos los organismos, inclusive los eucariotes, el contenido del ADN de todas sus células es idéntico. Esto quiere decir que contienen toda la información necesaria para la síntesis de todas las proteínas. Pero no todos los genes se expresan al mismo tiempo ni en todas las células. Hay sólo un grupo de genes que se expresan en todas las células del organismo y codifican para proteínas que son esenciales para el funcionamiento general de las células. El resto de los genes se expresan o no en los diferentes tipos de células, dependiendo de la función de la célula en un tejido particular. También existe especificidad temporal, esto quiere decir que los diferentes genes en una célula se encienden o se apagan en diferentes momentos de la vida de un organismo. Además, la regulación de los genes varía según las funciones de éstos. Mientras que las células procariotas transcriben casi todos sus genes, las células eucariotas eligen qué genes transcribir. Cada tipo celular eucariota expresa sólo una fracción de los genes que tiene, alrededor del 20%. Es decir, sólo el 20% de los genes que contiene el ADN se transcribe en ARN y luego se traduce en proteínas.

Las células sintetizan solamente aquellas proteínas que necesitan. Aún mas, pueden también regular la cantidad de proteínas que necesitan, produciendo 2, 3 o hasta 100 copias cada vez. Las células regulan, entonces, la expresión de sus genes mediante diferentes procesos, pero la forma más eficiente y usual es por medio del control **transcripcional**, por el cual la célula puede aumentar y disminuir la cantidad de ARN transcripto.

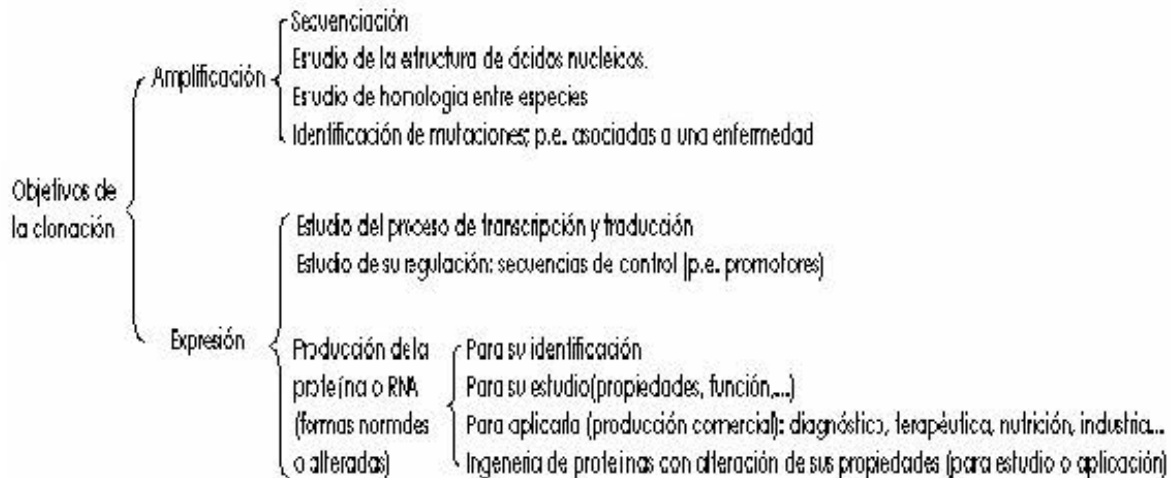
La biotecnología es el uso y manipulación de organismos vivos, o sustancias obtenidas a partir de ellos, para elaborar productos de valor para la humanidad. Esta nueva técnica consiste en aislar genes de un organismo e insertárselos a otro organismo, para producir un organismo con una nueva característica o rasgo (Crispeels, Sadava; 2003). Esto se logra mediante un proceso conocido como clonación.

## **Clonación**

Un clon es un grupo grande de células, moléculas de ADN, bacterias u organismos que surge de una célula o molécula ancestral y son idénticas a ella. Clonación es el proceso que le da origen a un clon.

El objetivo central de una clonación, entre otras (figura A-3), es la producción de un gran número de copias de una región de un ADN (pueden ser fragmentos o genes). Se trata, de un proceso de clonación tipo celular por que se consigue gracias al empleo de células y se considera que se realiza *in vivo* porque se realiza en cultivos celulares (Luque, Herráez; 2001).

La clonación se basa en un fragmento de ADN (fuente de ADN) a clonar llamado **inserto** que se une a otro DNA (vector de clonación) formando una molécula de DNA recombinante que se incorpora posteriormente a una célula hospedadora o anfitriona donde tiene lugar la amplificación por replicación (Luque, Herráez; 2001).



**Diagrama A-1.** Objetivos de la clonación

Para llevar a cabo una clonación se requiere de lo siguiente:

1. **Una fuente adecuada de ADN.** Las fuentes más importantes de ADN para la clonación son:
  - ADN genómico (cromosómico) que contiene los genes completos y
  - cDNA (ADN complementario) que se obtiene a partir del ARNm bajo la acción de la enzima transcriptasa reversa (inversa).

El gen, fragmento de gen o fragmento de DNA que se quiere clonar debe ser aislado de la muestra. Este posteriormente se fragmenta con enzimas de restricción, para dar lugar a una mezcla de fragmentos. El fragmento (inserto) que se va a clonar se debe de separar del resto mediante alguna técnica adecuada, por ejemplo electroforesis en gel de agarosa (Luque y Herráez, 2001).

Se denomina **enzima de restricción** o nucleasas de restricción a cualquier enzimas con capacidad de escindir o cortar los enlaces fosfodiéster de la cadena polinucleótida de los ácidos nucleicos en secuencias específicas de estos ácidos llamados **sitios de restricción** o reconocimiento (Luque, Herráez; 2001).

Las enzimas de restricción reconocen una secuencia de bases específica de cuatro a ocho pares de bases y cortan a ambas hebras de la cadena dúplex, dando lugar a **extremos** monohebra o **cohesivos** que son complementarios entre sí (Voet. Voet; 1995 y Crhrispeels, Sadava; 2003) y además son útiles para iniciar la clonación , entre otros procesos (Luque, Herráez; 2001).

2. **Un vector de clonación.** Un **vector de clonación** es una molécula pequeña de ADN con las siguientes características:

- Puede replicarse de manera autónoma en la célula huésped, utilizando la maquinaria enzimática de dicha célula.
- Pueden seguir su desarrollo normal a pesar de que secuencias adicionales de ADN sean incorporadas en su material genético.
- No se mezclan con el ADN genómico de la célula.
- Son fáciles de introducir en la célula huésped, de aislar y caracterizar.
- Su secuencia y mapa de restricción son conocidos.
- Deben de contar con **genes** denominados **marcadores**, que sirven para identificar a las células que contienen el vector de clonación. Comúnmente se utilizan **genes de resistencia a antibióticos** que le confieren a la célula la capacidad para desarrollarse bajo la presencia de un antibiótico en especial.

Es conveniente que el vector posea el mayor número posible de sitios de restricción, para insertar el fragmento de DNA que se quiera incorporar (Luque y Herráez, 2001) en un corte del vector hecho con la misma enzima de restricción que se empleo para obtener el inserto. Así, los extremos complementarios de los dos DNAs se asocian bajo condiciones de apareamiento de las bases y se empalman covalentemente por acción de una enzima denominada **DNA ligasa** (Voet, Voet; 1995), que tiene la capacidad de formar enlaces fosfodiéster en una cadena de ADN rota. De tal manera que la unión de un vector de clonación con un inserto se le denomina **DNA recombinante (rDNA)** (Luque, Herráez; 2001).

Aunque existen diferentes tipos de vectores, por conveniencia sólo se describirán a los plásmidos.

Los **plásmidos** son moléculas de ADN (doble hebra) circular de pequeño tamaño. Están presentes en forma libre en el citosol de muchas bacterias principalmente. Se replican con independencia del cromosoma bacteriano (tienen su propio origen de replicación). Son fáciles de purificar a partir del cultivo y permiten la incorporación de insertos de un tamaño máximo de unas 10 KB.



3. **Una célula hospedadora.** Las moléculas de rDNA requieren que se introduzcan a una célula hospedadora que le ofrezca la maquinaria necesaria para su autorreplicación. Las moléculas de rDNA incorporado se replica de acuerdo a las propiedades del plásmido. Las **células procarióticas hospedadoras**, principalmente *E. coli* son las que se emplean con mayor frecuencia por ser fáciles de obtener, manipular, y conocer su genética (Luque, Herráez; 2001).
4. **Incorporación del DNA recombinante a la célula hospedadora.** Este paso consiste en introducir el vector que contiene al inserto que se desea clonar en la célula hospedara, para que ésta, al multiplicarse, origine un clon. Existen varios métodos que dependen del tipo de célula hospedadora. Para células procariotas cuando se desea introducir un plásmido se denomina **transformación** (Luque, Herráez; 2001). Este proceso ocurre espontáneamente en ciertos tipos de bacterias y se consigue artificialmente sometiendo a la célula bacteriana a tratamientos físicos y químicos. La célula capta moléculas de ADN que se encuentran en el medio externo, las introduce en su interior y las incorpora a su genoma.
5. **Identificación y selección de los clones resultantes.** Dado el gran número de células empleadas en la clonación, y la diversidad de productos que pueden originarse, es esencial poder diferenciar que células o colonias han incorporado realmente el DNA recombinante deseado. Para fines de este proyecto se emplearon **métodos genéticos** o de **selección genotípica** basados en la detección y selección gracias a la presencia en el plásmido de genes marcadores. Por ejemplo el gen *amp* codifica una  $\beta$ -lactamasa, sustancia capaz de degradar a la ampicilina (Luque, Herráez; 2001).