



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

“Crecimiento en suelos salitrosos de *Nicotiana tabacum*
modificada con el gen *ARO4* de la levadura halotolerante
Debaryomyces hansenii”

T E S I S

Que para obtener el título de

BIÓLOGA

P R E S E N T A

Edith López Estrada

Directora de tesis: Dra. Claudia Marissa Calderón Torres

Revisores

Dra. Angeluz Olvera Velona

Mtra. Josefina Vázquez Medrano

Mtra. María del Rocío Reyero Saavedra

Biol. Marcial García Pineda

“Por mi raza hablará el espíritu”

Los Reyes Iztacala Edo. de México 2018





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.

El presente trabajo tuvo la supervisión de la Dra. Claudia Marissa Calderón Torres y se realizó en el laboratorio de Inmunoparasitología de la Unidad de Biomedicina (UBIMED) en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala y en el laboratorio 306 oriente del Instituto de Fisiología Celular.



Agradecimientos

Principalmente a la Dra. Calderón, un enorme gracias por la paciencia, el conocimiento y la entrega con la que me ayudo a que a sacar este trabajo adelante, por la escucha en mis momentos de crisis, ya que eso me hizo valorarla más allá de una directora de tesis, en usted encontré una amiga. Este logro es mutuo.

Un sincero agradecimiento al Dr. Emérito Antonio Peña Díaz, por el material y el espacio brindado, por esas ganas de acercar a la juventud a la investigación científica con la gracia en transmitir su conocimiento.

A mis compañeras de trabajo, Elenka: gracias por tus burlas en cada momento que podías, eso me ayudo a pasar buenos ratos cuando sentía que ya no podía más. Lirio: Platicar contigo era de las cosas más relajantes en momentos de estrés. Nunca dejen de sonreír.

Al laboratorio 306 oriente que me ofreció su ayuda en todo momento que lo necesitaba, especialmente a la Dra. Norma y Martha.

Al laboratorio 8 de la Unidad de Biomedicina, en especial a Yadi, por brindarnos los espacios y el material para llevar a cabo la experimentación

Al Biólogo Marcial García Pineda, por compartirnos su espacio, interés y conocimientos en la germinación y crecimiento de nuestras plantitas

A mi comité revisor, por tener la paciencia y el tiempo en darme cada una de sus observaciones del presente trabajo.



Dedicatorias

A mamá Lourdes Estrada:

Gracias por no abandonarme en este camino, por tu apoyo y la ayuda en poder culminar este trabajo, sé que no ha sido fácil para ninguna de las dos, pero el cariño y el amor que nos tenemos siempre tiene que ir por encima de todo. Te amo mamá. Chip, ¡lo logramos!

A mis hermanos Omar y Jorge Isaac:

Hermanos siempre es un buen momento para dejar ir las cosas que en su momento no se pudieron solucionar, perdonar y volver a comenzar. Aunque no coincidimos en nuestras ideas los quiero muchísimo.

A mis abuelos:

Esto no hubiera sido posible sin su ayuda, gracias por inculcarme el estudio desde muy pequeña. Mi gran ejemplo siempre serán ustedes.

A mi padre Jorge López:

Nunca es tarde. Te quiero papá.

A mi mejor amiga Yenifer:

A veces me pregunto ¿Qué tan aburrida y frustrante sería mi vida si tú no hubieras llegado a ella? Mana, gracias por apoyarme en todas y cada una de mis locuras, por ser mi cómplice en todo. Gabi, recuerda lo mucho que vales y lo importante que eres para mí y para ti. Te quiero Camarona.



A mi mejor amigo Axel:

Eres un gran cómplice y amigo, tienes esa opinión que siempre tomo en cuenta y sobre todo, tienes esa sinceridad que cualquier otra persona no la hubiera soportado. Gracias Manatí bebé.

A Alan:

Un día apareció en mi vida un motorcito que cada mañana me dice: *¡vamos, venga!, con todo menos con miedo*. Desde entonces soy muy feliz. Te amo.

A mis amigos:

Belina Paredes las horas de clase y las horas que estamos juntas serían muy aburridas si no existieran tus ocurrencias. *Lorena Campos* el recuerdo más bonito siempre será el lago de los cisnes, sigamos construyendo más. *Pedro Castro* toda la carrera fueron dulces momentos gracias a ti. *Marco Virgilio* yo estoy de acuerdo en que nunca estés de acuerdo. Defiende tus ideales. *Sarahí Rodríguez* y *Arturo* aparecieron al final de este camino, pero pareció que siempre estuvieron ahí. Los quiero muchísimo *Joan Nigoni* eres un ejemplo de persona, uno nunca debe de rendirse en las circunstancias más adversas. *Anahí, Rafa, Miguel y Juan* sigo pensando que encontrarnos no fue casualidad, el CCH fue demasiado grato a su lado.

Y sobre todo a mi amada **UNAM** por brindarme la formación, para poder llegar a ser un profesionalista.



*“Los hombres han olvidado esta verdad –dijo el zorro–
pero tú no debes olvidarla.
Eres responsable para siempre de lo que has
domesticado.”*

*El Principito
Antoine de Saint-Exupéry*



Índice	Páginas
Índice-----	I
Índice de figuras -----	II
Índice de tablas-----	III
Resumen-----	IV
1. Introducción-----	1
1.1. Situación actual de la agricultura en México-----	1
1.2. Salinidad en los suelos agrícolas-----	3
1.3. La entrada de Na ⁺ en las plantas-----	5
1.3.1 Canales iónicos en la membrana plasmática-----	6
1.4. Efecto de la salinidad en las plantas-----	7
1.5. Respuesta celular de las plantas bajo estrés salino-----	10
1.6. Mejoramiento genético-----	13
1.6.1. Organismos modificados genéticamente para el mejoramiento de suelos-----	14
1.7. Debaryomyces hansenii aplicaciones biotecnológicas en la agricultura—	16
2. Antecedentes-----	17
3. Justificación-----	18
4. Hipótesis-----	18
5. Objetivos-----	19
5.1. Objetivo general-----	19
5.1.1 Objetivos particulares-----	19
6. Materiales y métodos-----	20
6.1. Análisis de suelo-----	20

6.2. Verificación de la presencia del gen <i>DhARO4</i> en la planta de <i>Nicotiana tabacum</i> -----	21
6.3. Material vegetal	
6.3.1. Germinación de plantas-----	22
6.3.2. Trasplatación-----	22
6.3.3. Diseño experimental-----	23
6.4. Procesamiento de las muestras-----	23
6.4.1. Colecta del material vegetal-----	23
6.4.2. Evaluación de especies reactivas de oxígeno-----	24
6.4.3. Proteínas totales-----	24
6.4.4. Determinación de iones solubles: Na ⁺ y K ⁺ -----	24
6.4.4.1 Suelo -----	25
6.4.4.2 Hoja, tallo y raíz-----	25
6.4.5. Cuantificación de clorofilas-----	26
6.5. Análisis estadístico-----	26
7. Resultados-----	27
7.1 Parámetros morfológicos-----	27
7.2 Parámetros bioquímicos-----	30
7.2.1. Especies reactivas de oxígeno-----	30
7.2.2. Iones solubles-----	32
7.2.2.1. Na ⁺ : Hoja, tallo y raíz-----	32
7.2.2.2. K ⁺ : Hoja, tallo y raíz-----	35
7.2.2.3. Na ⁺ y K ⁺ : Suelo-----	37
7.2.3. Clorofilas totales, a y b-----	39
8. Discusión-----	40
8.1. Parámetros morfológicos y especies reactivas de oxígeno-----	40
8.2. Clorofilas-----	44
8.3. Iones solubles-----	45
9. Conclusiones-----	48

10. Literatura citada-----	49
11. Anexos-----	56

Índice de figuras

Figura 1. Balanza comercial agropecuaria y agroindustrial -----	2
--	---

Figura 2. Entrada del ion Na ⁺ a la planta y transportadores de proteínas que están involucrados en la captación y distribución de Na ⁺ -----	6
--	---

Figura 3. Participación de las ERO en el cierre de estomas y apertura de estomas por H ⁺ ATPasa. -----	12
--	----

Figura 4. Transformación de la planta de tabaco en medio <i>Agrobacterium tumefaciens</i> -----	15
--	----

Figura 5. Presencia del gen <i>DhARO4</i> de la levadura <i>D. hansenii</i> en <i>Nicotiana tabacum</i> -----	21
--	----

Figura 6. Parámetros morfológicos-----	27
---	----

Figura 7. Plantas de tabaco con 58 días de crecimiento -----	28
---	----

Figura 8. Especies reactivas de oxígeno -----	30
--	----

Figura 9. Iones solubles en hoja, tallo y raíz (Na ⁺) -----	33
--	----

Figura 10. Iones solubles en hoja, tallo y raíz (K ⁺) -----	35
--	----

Figura 11. Iones solubles en suelo (Na ⁺ y K ⁺) -----	37
---	----

Figura 12. Clorofilas totales, a y b -----	39
---	----

Índice de tablas

Tabla I. Composición de los elementos principales de la tierra empleada en el cultivo de <i>Nicotiana tabacum</i> .-----	20
---	----



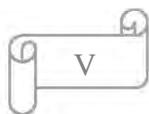
Resumen

El gen *DhARO4*, de la levadura halotolerante *Debaryomyces hansenii* le proporciona resistencia al estrés oxidante cuando esta levadura se encuentra bajo condiciones de estrés salino hasta una concentración de NaCl 2M. En el presente trabajo se modificó la planta *Nicotiana tabacum* con este gen, el objetivo fue proporcionarle a la planta resistencia a estrés salino por NaCl 100 mM. El interés de esta transformación se debe a que la salinidad es uno de los principales problemas con los que se enfrenta la agricultura hoy en día, siendo una limitante en el cultivo de una amplia variedad de especies; por ello la mejora genética se convierte en una herramienta valiosa, especialmente cuando se utilizan organismos con un fenotipo favorable de resistencia a la alta salinidad, de los que se pueden seleccionar genes para la transformación y mejora de plantas de interés agrícola; y por lo tanto contribuir a resolver el problema del bajo rendimiento de cultivos en suelos con salinidad elevada.

En este trabajo se emplearon 2 tipos de plantas: silvestres (WT) y plantas modificadas (OMG), las cuales se sometieron por 52 días (después de su trasplante) a un estrés de NaCl 100mM. Bajo estas condiciones, el tamaño y número de hojas disminuyeron en las plantas WT, por el contrario las especies reactivas de oxígeno (ERO), en partes de la planta (hoja y tallo) aumentaron en plantas OMG. En la determinación de los iones solubles, sodio (Na⁺) y potasio (K⁺), en la raíz de las plantas OMG en condiciones de riego con NaCl 100 mM, se encontró la menor acumulación de Na⁺ y una concentración elevada de iones de K⁺. Por otro lado el suelo donde estuvieron sembradas las plantas WT y OMG con riego de NaCl 100 Mm presentó el valor más alto de Na⁺. Por último la clorofila a se mostró en mayor cantidad en plantas OMG con riego de NaCl 100mM.

Aunque se esperaba que la expresión del gen *ARO4* en la planta OMG redujera los niveles de ERO en las tres partes de la planta cuando esta se encontraba bajo estrés salino, en este trabajo se observó que aunque los niveles de las plantas

OMG se muestran mayores con respecto a las plantas WT, el crecimiento de las OMG no se vio afectado cuando se encontraba bajo estas condiciones.



1. Introducción

1.1 Situación actual de la agricultura en México

La agricultura en México es una de las principales actividades primarias en el país, prácticamente casi toda la producción de alimentos consumidos proviene de esta actividad, ya que el país cuenta con mayor exportación en el sector agrícola (Figura 1). En el territorio nacional de 198 millones de hectáreas (ha), 27.5 millones se destinan a la agricultura, en las cuales el 81.5% corresponde a superficie sembrada o plantada (SAGARPA-INEGI 2014; SAGARPA, 2017); de las cuales las especies mayormente cultivadas son: aguacate, jitomate, pimiento, fresas, frambuesas, pepino, almendras, nueces, pistaches, café, melón, sandía, papaya etc. (SAGARPA, 2017).

Como se observó anteriormente, que uno de los principales objetivos actuales de la agricultura es cultivar una amplia variedad de especies y también la obtención de altos rendimientos en cosechas, esto para obtener una mejor producción y competencia en el mercado, pero estos objetivos no son fáciles de lograr debido al manejo inadecuado del suelo, ya que muchas veces este se asigna para uso industrial, comercial y residencial. Aunado a esto, otro de los problemas es que las áreas productivas se vuelven inestables por diferentes procesos, por ejemplo la erosión (Browyn *et al.*, 2007).

La erosión se define como un proceso de desprendimiento, transporte y acumulación de suelo, causado por factores naturales como la lluvia y el viento, además del factor humano que al cultivar de forma continua sin descanso y cuidado del suelo, acaban por afectar los agregados primarios del suelo y conduce a la disminución de la capacidad de infiltración de humedad (INEGI 2015).

Una vez que los suelos de cultivo se erosionan, disminuye la producción de cultivos y se presentan situaciones de estrés abiótico (anoxia, hiperoxia, deficiencia de minerales, sequía, cloruro de sodio (NaCl) choque osmótico y especies reactivas de oxígeno (ERO), estrés biótico ocasionado por

microorganismos patógenos (bacterias, hongos y virus), insectos, herbívoros y roedores y xenobiotico causado por herbicidas, contaminantes atmosféricos y metales pesados. De acuerdo a informes de la Organización de las Naciones Unidas (ONU), se estima que para el año 2030 la demanda de alimentos será 60% mayor que la actual (Mahaja y Tuteja 2005).

Por ello se plantea que la degradación del suelo por la agricultura ocurre a tal velocidad que es uno de los grandes retos para poder alcanzar la demanda de alimentos; de esta problemática derivan objetivos como la disminución y de ser posible revertir el deterioro del suelo o adaptarlo a nuevas condiciones limitantes.

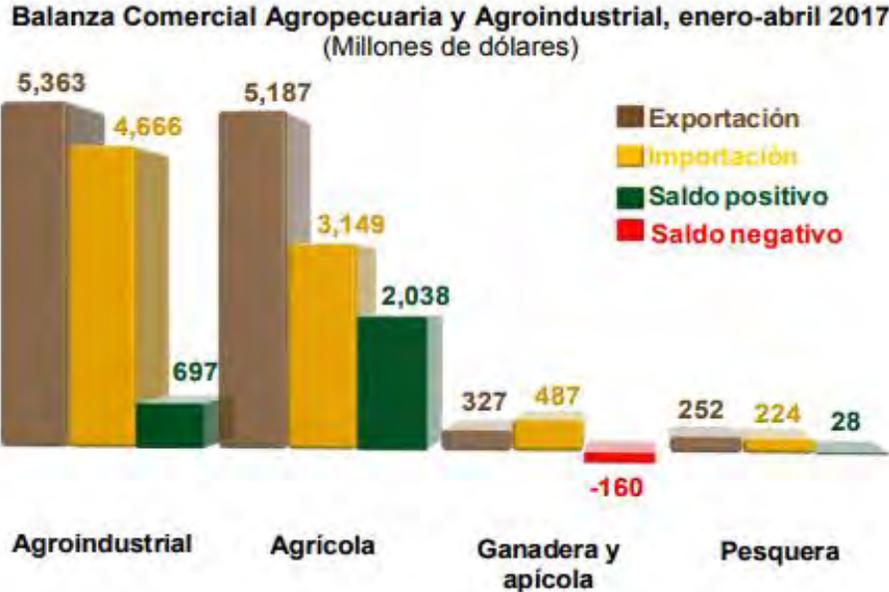


Figura 1. Balanza comercial agropecuaria y agroindustrial, Enero-Abril 2017. Fuente: Servicio de información agroalimentaria y pesquera (SIAP); Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (SAGARPA), 2017.

1.2 Salinidad en los suelos agrícolas.

El estrés abiótico es el principal causante de daños a cultivos y el problema de la salinidad es el más severo. Se considera que un suelo es salino cuando tiene una concentración de NaCl 40 mM (Marschner 1995). Con este valor se determinó que una tercera parte de las áreas de cultivo en el mundo, de aproximadamente 300 millones de ha, están afectados por salinidad y que de estas, 70 millones fueron causadas por actividad humana (FAO 2008).

La salinización del suelo, es un problema que se incrementa año con año en regiones áridas y semi áridas en el mundo, debido a las bajas precipitaciones anuales, un mal manejo de aguas de riego, uso excesivo de fertilizantes y cambio climático (Villa *et. al.*, 2006).

La zona árida es definida por una precipitación anual inferior de 250 mm con 8 a 12 meses secos y la zona semiárida tiene una precipitación anual de 250 mm a 450 mm con 6 a 8 meses secos (Nobel en Monroy *et. al.*, 1999; Florescano 2004).

En América latina, en las zonas centro y sur más secas, el cambio climático provoca la salinización y desertificación de la tierra agrícola. De igual manera se pronostica que los cambios en los ciclos de las precipitaciones y la desaparición de los glaciares afecten significativamente la disponibilidad de agua para consumo humano y para la agricultura (IPCC, 2007).

La salinidad y la sequía son dos factores limitantes ambientales que afectan el establecimiento y el desarrollo de especies, así como la producción agrícola (Madueño *et al.*, 2006). El problema de salinidad afecta aproximadamente el 25% de los 230 millones de ha irrigadas del planeta (Meloni *et al.*, 2008). En México, 29.3 millones de ha son utilizadas para actividad agrícola, de las cuales 500,000 son improductivas debido a la alta concentración de sales que poseen (Partida *et al.*, 2006). Para el año 2007 este problema se fue agravando en México, aumento el área afectada irrigada al 10%, y de esta, el 64% se localiza al norte del país, en los estados correspondientes a las zonas áridas y semi-áridas (Ramírez *et al.*, 2008).

La República Mexicana cuenta con una superficie de un 1 millón 958 mil 201 km², de los cuales el 52% corresponde a regiones áridas y semiáridas con predominio de climas secos (Conaza, 1994). Estas zonas se encuentran principalmente en las partes bajas de Sonora, Baja California Norte y Sur y en el centro-norte del país en porciones de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Zacatecas, San Luis Potosí, Durango y Tamaulipas. Al centro sur del país se encuentran algunas áreas que tienen condiciones de semiáridéz, parte de los estados de Querétaro, Hidalgo Puebla, Oaxaca e inclusive Guerrero (Gonzales, 2003).

Estas regiones ya tienen algún grado de degradación, 60% presentan problemas de salinidad además de que las aguas utilizadas para su riego cada vez tienen una mayor concentración salina. Por lo que respecta a las áreas de cultivo por riego se considera que un 10% del área está afectada por salinidad (SEMARNAT, 2003)

1.3. La entrada de Na⁺ en plantas

El crecimiento de una planta depende del suministro de nutrientes inorgánicos en el suelo y uno de los principales problemas a los que se enfrenta una planta es su baja disponibilidad; sin embargo para adecuarse a estas condiciones, las plantas han diseñado mecanismos adaptativos que les permite asimilar los nutrientes necesarios para su desarrollo óptimo aun en condiciones de baja disponibilidad o cuando se presentan iones tóxicos como el Na⁺ (Bronwyn *et al.*, 2007).

La entrada significativa de Na⁺ en la epidermis y corteza de la raíz se le conoce como influjo a la planta y esto da como resultado una reducción severa en el crecimiento de las especies que son altamente sensibles a las sales, como por ejemplo las glicofitas. La entrada de este ion es un proceso general (Figura 2) que comprende tres pasos:

- 1) La interfaz de suelo/raíz en el cual por vía intercelular (simplasto) las membranas de las células epidérmicas y corticales, determinan que ion entra por esta vía y en qué medida.

- 2) La interfaz entre raíz/xilema, las células parénquimales, ejercen un segundo nivel de control para el ion que está entrando y así poderlo translocar a los brotes.
- 3) Partición del ion, esto ocurre a nivel celular entre el citoplasma y la vacuola y a nivel de tejido que permite la circulación de Na^+ y K^+ en hojas viejas y jóvenes (Walker *et al.*, 1996)

1.3.1 Canales iónicos en la membrana plasmática

Para la entrada de él ion Na^+ a la planta y como es distribuido en las células y el tejido, podemos profundizar en el desplazamiento del ion entre los diferentes y tejidos y los compartimentos celulares. En este último caso necesitamos saber de los transportadores de membrana que catalizan el movimiento del Na^+ (Popova *et al.*, 2006).

Conocer los transportadores y los canales involucrados durante el estrés salino y como son regulados, es de gran utilidad en la investigación enfocada al mejoramiento de las plantas contra la salinidad. Los canales como los catiónicos no selectivos (NSCC), el saliente rectificador de potasio (KORC) y los catiónicos no codificantes (NCC), presentan actividad cuando hay una despolarización de los potenciales de membrana plasmática (MP), provocados por NaCl y pueden mediar el intercambio de Na^+ y K^+ a través de la MP. Por otra parte los canales intercambiadores de Na^+ /protones H^+ (NHX), SOS, el canal de intercambio de H^+ (CHX) y los transportadores de alta afinidad para el K^+ (HKT), actúan intercambiando y provocando la salida de un protón por la entrada de Na^+ y la mayoría de estos canales son activados por la bomba de protones en el tonoplasto (ATPasa) (Barkla *et al.*, 1995) La inducción de la actividad de la proteína del transporte con intercambio de Na^+/K^+ , juega un papel muy importante en la tolerancia a la salinidad, regulando el control del pH y la osmorregulación del organelo en donde se exprese, pero cuando el estrés salino es severo, puede ocasionar en las plantas efectos fisiológicos que se vuelven difíciles de regular (Browyn *et al.*, 2007)

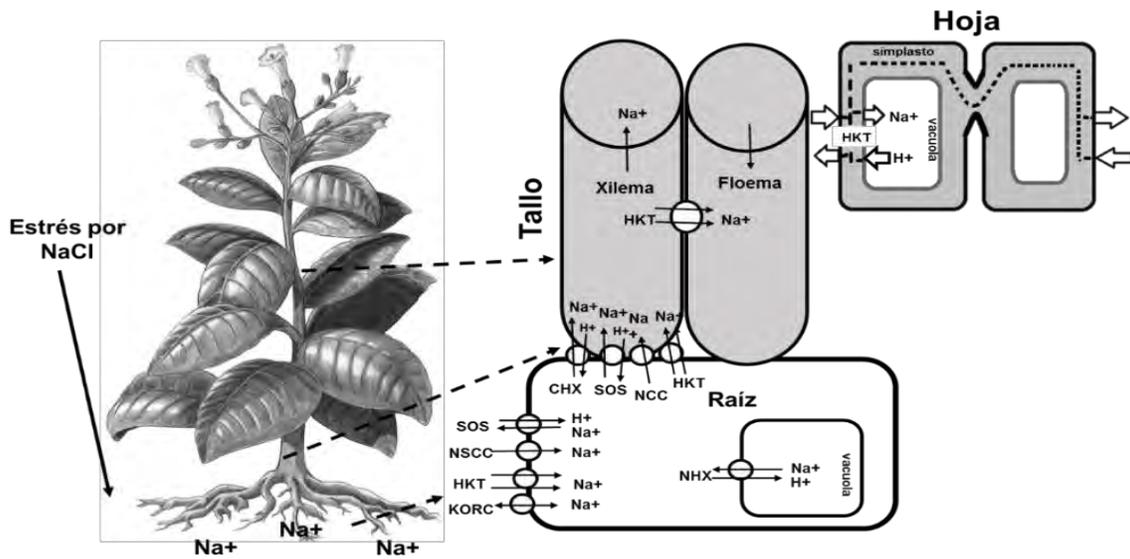


Figura 2. Entrada del ion Na^+ a la planta y transportadores de proteínas que están involucrados en la captación y distribución de Na^+ . CHX canal intercambiador de H^+ ; HKT transportadores de alta afinidad para potasio; NHX intercambiador de Na^+/H^+ ; NSCC canales catiónicos no selectivos; KORC (canal saliente rectificador de potasio y NCC canales catiónicos no codificantes (Figura modificada de Maathuis 20014; Maathuis y Amtmann 1999).

1.4 Efecto de la salinidad en plantas

El cultivo de plantas en áreas con problemas de salinidad, provoca en las plantas efectos fisiológicos como la disminución de la fotosíntesis, efectos morfológicos como disminución de área foliar, pérdida de peso en los frutos y también efectos bioquímicos tales como cambios cualitativos y cuantitativos en la síntesis de proteínas, debido a cambios en la expresión de genes de respuesta al aumento de la salinidad en los suelos (Pérez *et al.*, 1996; Singh y Chatrath, 2001).

Esta causa de reducción en el crecimiento y desarrollo de las plantas cuando son cultivadas en suelos salinos, puede estar ligada a que esta sufre tres tipos de estrés y estos pueden desencadenar un cuarto tipo de estrés que se mencionan a continuación:

- a) Estrés hídrico
- b) Toxicidad iónica específica
- c) Desbalance nutricional
- d) Incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno que dañan las macromoléculas (Nawaz *et al.*, 2010).

a) Estrés hídrico.

Cuando hay una concentración excesiva de solutos en el suelo, se produce una disminución en el potencial osmótico ($\Psi\pi$) y el potencial hídrico (Ψ), por lo tanto el balance hídrico de la planta se encuentra afectado ya que para mantener un gradiente en el suelo y la parte aérea de la planta, esta debe de generar un potencial hídrico (Ψ) más negativo que la solución que recibe del suelo. Este efecto que generan los solutos disueltos en agua, es similar a una falta de agua en el suelo (Cristo *et al.* 2001)

También se ha visto que las plantas que sufren un estrés osmótico, tienen una respuesta fisiológica de inmediato en la célula, en los primeros minutos en los que una planta está expuesta a niveles de salinidad altos, la planta se deshidrata y se encoge, pero horas después puede restaurar su forma original con una disminución de la tasa de elongación. Días después el crecimiento de las hojas es menor debido a que son más sensibles al sodio que las raíces y en semanas puede comenzar a perder las hojas (Munns 2001).

b) Toxicidad iónica específica.

Esta se produce por la captación y acumulación de ciertos iones disueltos en el agua de riego y absorbidos por la planta, los principales iones involucrados en la toxicidad son el cloruro (Cl^-), el sulfato (SO_4) y el sodio (Na^+), aunque son iones esenciales para el crecimiento (González y Ramírez 1999), que pueden almacenarse en la vacuola, pero cuando se encuentran en una concentración alta de Na^+ y Cl^- , son tóxicos porque inhiben la actividad enzimática de proteínas del

metabolismo central, disminuyen o alteran la fluidez de la membrana plasmática e inhiben la fotosíntesis (Karimi *et al.*, 2009) y todo ello afecta el crecimiento de la planta (Yuen *et al.*, 2004).

c) Desbalance nutricional.

Otra de las causas de la presencia de iones tóxicos en el suelo, está dada por la interacción con nutrientes y minerales. El desbalance iónico en condiciones de alta salinidad, se produce cuando la acumulación excesiva de Na^+ y Cl^- reducen la captación de otros minerales como son el potasio (K^+), calcio (Ca^{2+}) y manganeso (Mn^{2+}) (Karimi *et al.*, 2009).

d) Especies reactivas de oxígeno.

En las plantas las ERO son continuamente producidas como productos en varias rutas metabólicas localizadas en diferentes compartimentos celulares, especialmente en donde se da la transferencia de electrones como en las mitocondrias y cloroplastos. En los peroxisomas, retículo endoplásmico (RE), pared celular (PC), apoplasto y citoplasma también hay producción de ERO (Amirsadeghi *et al.*, 2007; Van Breusegem y Dat 2006).

Los factores antes descritos provocan en las células de la planta un desequilibrio metabólico y como consecuencia un estrés oxidante (Chinnusamy y Zhu 2004). Por ello el aumento de las especies reactivas de oxígeno (ERO) como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), superóxido (O_2^-) y radicales hidroxilo ($\cdot\text{OH}$), pueden causar en las plantas reacciones fito tóxicas como la peroxidación de lípidos, la degradación de proteínas y mutaciones en el ADN (Eyidogan y Oz 2007; Joseph y Jini 2011).

Las ERO no sólo deben de ser consideradas como agentes tóxicos producidos por el metabolismo aerobio, sino que ahora se han reconocido como agentes regulatorios y de señalización (Miller *et al.*, 2004). También están envueltas en la regulación de respuestas de defensa y muerte celular (Zhang, 2003), gravitropismo y apertura de estomas, crecimiento polar, expansión celular,

crecimiento y desarrollo floral y crecimiento de pelos radicales (Kwak et al., 2003; Foreman *et al.*, 2003).

Las ERO producidas ante el estrés abiótico, actúan como señales de cambio, regulan la expresión de genes y regulan la actividad de canales iónicos (Pie *et al.*, 2000; Foreman *et al.*, 2003). Los mecanismos mediante los cuales se llevan a cabo distintas respuestas, se complementa con la producción de enzimas de los sistemas antioxidantes, además de que necesitan una serie de proteínas y lípidos para poder transmitir las respuestas como las fosfolipasas y ácidos fosfatídicos (Mittler *et al.*, 2004; Zhang, 2003).

En casos extremos cuando las plantas están sometidas a un estrés por factores fisicoquímicos del ambiente, se rompe el balance entre la producción de ERO y la actividad de los sistemas antioxidantes llevando así a la célula a una condición denominada estrés oxidante que puede ocasionar diferentes daños celulares (Shalata *et al.*, 2001).

En resumen, la inducción de estrés salino influye directamente en el metabolismo de las plantas y por consiguiente en su crecimiento y desarrollo lo que tiene un costo desde el punto de vista del rendimiento agrícola.

1.5 Respuesta celular de las plantas bajo estrés salino.

Como se menciona en el apartado 1.2, la salinidad es uno de los principales factores abióticos que limitan la productividad agrícola debido a que la inmensa mayoría de las plantas cultivadas son sensibles a esta condición. Su efecto más común se ve reflejado en el desarrollo de la planta debido a la disminución del pH del medio, trayendo como consecuencia una disminución en el ψ (García y Jáuregui 2008).

El estrés salino ocurre por la captación elevada de los iones Na^+ y Cl^- , los cuales inducen serias alteraciones en el metabolismo de la planta, que repercuten en su crecimiento y desarrollo. Sumando lo anterior, esto conduce a otros tipos de estrés como estrés osmótico y estrés hídrico (Sudhir y Murthy 2004).

Uno de los mayores efectos causados por estos tipos de estrés en las plantas es la toxicidad iónica, dado por el reemplazo del K^+ por el Na^+ en las reacciones bioquímicas normales, así como en los cambios conformacionales y pérdida en la función de proteínas provocando a la vez un estrés oxidante (Zhu 2003). En el citosol, la presencia de K^+ es esencial para la activación de muchas enzimas, por ejemplo, las involucradas en la síntesis de piruvato y traslocación de proteínas. Las similitudes fisicoquímicas entre el Na^+ y K^+ provoca que cuando se presenta exceso de Na^+ en la célula, tiende a sustituir al K^+ en los sitios de unión, afectando la bioquímica celular (Mathuis 2006).

Otro efecto negativo que tiene son las interacciones de Ca^{2+} y componentes celulares como las pectinas de la pared celular y fosfolípidos de la membrana, ya que estas son sensibles al exceso de cationes como el Na^+ . Aunque estos sitios tienen mayor afinidad por el Ca^{2+} que para el Na^+ , debido a la proporción molar tan grande de $Na^+ : Ca^{2+}$, la cual permite la disociación de Ca^{2+} de sus sitios de unión, afectando la integridad de la pared celular y de las membranas celulares (White y Broadley 2003).

Un proceso al cual se enfrentan las plantas cuando el mesófilo comienza a sentir deshidratación, es el cierre de los estomas. Este proceso está regulado por el ácido abscísico (ABA) (Leung y Giraudat, 1998). Los estomas están situados en la epidermis de las hojas, tallos jóvenes y raíces, están rodeados por las células epidérmicas especializadas que reciben el nombre de las células guarda. La acumulación de ABA en las hojas activa la producción de H_2O_2 en las células guarda a través de dos fuentes, la NADPH oxidasa (NOX) y los cloroplastos. El H_2O_2 inactiva los canales de entrada del K^+ y activa los canales de entrada de Ca^{2+} de la membrana plasmática, el aumento de este ion en el citosol participa también en la regulación de los canales de aniones, dando por resultado una reducción en la turgencia de las células guarda y en consecuencia el cierre de los estomas (Zhang y outlow 2001). Recientemente se ha encontrado que en el cierre de estomas participa el $NO\bullet$ producto de la nitrato reductasa (NR). La actividad de la NR está fuertemente regulada tanto a nivel transcripcional como

postraducciona por diversos factores como la luz, la temperatura, la disponibilidad de CO₂ y de O₂, todos estos factores regulan también el cierre de estomas. Al parecer la formación de las ERO por ABA, interviene en la alcalinización de las células guarda (Figura 3) (Bedard y Krause 2007).

Ante esta situación la planta tiene una respuesta adaptativa la cual conlleva a activar la transcripción de genes de respuesta regulados por ABA para hacer frente al estrés hídrico. Las ERO pueden activar las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitógeno), las cuales sintetizan solutos compatibles por ejemplo carbohidratos (sorbitol, manitol, glicerol y polioles cíclicos), compuestos nitrogenados (proteínas, glutamato, glicina y colina) y ácidos orgánicos e inorgánicos (oxalato, malato y prolina) (Mahan y Tujeta, 2005; Hasegawa *et al.*, 2000). Estos compuestos son llamados osmo-protectores, porque proporcionan protección al estrés osmótico-hídrico, y por qué actúan como osmoreguladores del $\psi\pi$ y facilitan la retención de agua en el citoplasma. Aunque hay controversias, ya que la suma de todos los compuestos orgánicos compatibles u osmoprotectores no parecen ser necesarios para contrarrestar la gran concentración de solutos en el suelo, se ha visto que los polioles permiten el secuestro del Na⁺ en la vacuola y en el apoplasto y también protegen a las membranas celulares del daño oxidativo provocado por las ERO, regulando las actividades de varios antioxidantes (Bohnert, 2005; Yan *et al.*, 2000).

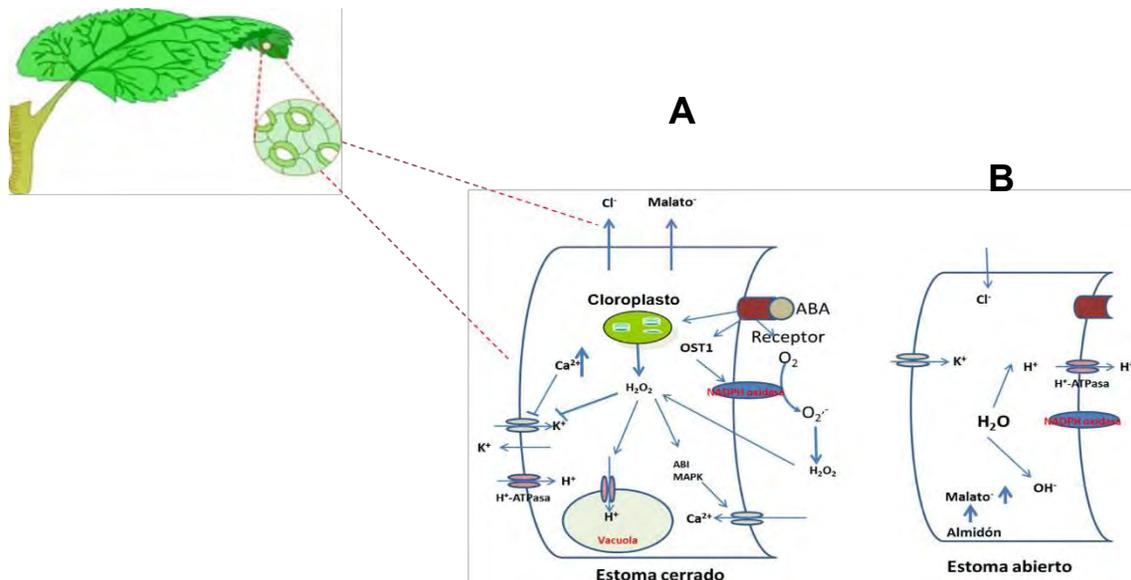


Figura 3. Participación de las ERO en el cierre de estomas y apertura de estomas por H^+ -ATPasa. **A.** Modelo del cierre de estomas inducido por el ácido abscísico (ABA). El ABA puede ser percibido por un receptor desconocido o por algunos componentes de la membrana como la oxidasa dependiente de NADPH (NOX). Las ERO producidas por esta señalización activan los canales de Ca^{2+} , además de inducir la expresión de genes como ABI1 Y ABI2. **B.** La entrada de K^+ se produce por el bombeo activo de H^+ fuera de las células oclusivas por acción de una H^+ -ATPasa de membrana. La entrada de K^+ se equilibra con una entrada de Cl^- y sobre todo con la acumulación del ion malato. (Imagen modificada de Sanchez y Aguirreola, 2001).

1.6 Mejoramiento genético

La mejora genética se convierte en una herramienta para la recuperación de zonas donde la salinidad es un factor limitante de la producción agrícola (Kumar *et. al.*, 2009). Esta problemática de salinización del suelo en estas zonas, ha conducido a que los programas institucionales de la agricultura, actualmente incluyan la mejora genética, así como la identificación de los indicadores viables para la selección de genotipos con un comportamiento adecuado en estas condiciones desfavorables con lo que se espera solucionar los problemas de salinidad en los suelos de cultivo y con ello disminuir los problemas de la producción agrícola (Cristo *et. al.*, 2001).

Por lo anterior mencionado es necesario comprender los mecanismos fisiológicos de respuesta al estrés salino, a fin de generar información útil que pueda ser usada en programas de mejoramiento genético e incrementar su tolerancia a la salinidad en los cultivos.

Para mejorar la agricultura se han establecido diferentes objetivos, entre ellos se enmarca las aplicaciones de biotecnología para la recuperación de suelos y el mejoramiento de la resistencia de la plantas a la alta salinidad del suelo. En el mejoramiento de plantas se emplean técnicas clásicas de selección de las mejores plantas que pueden crecer en suelos con salinidades elevadas (denominados salitrosos) así como la modificación genética de plantas (Acquaah, 2006). Este interés por mejorar la tolerancia de los cultivos a la salinidad ha ido creciendo en los últimos años, empleando métodos de mejora y selección tradicionales o producción de organismos modificados genéticamente con la incorporación de genes de organismos con una tolerancia elevada a estrés salino (Hasegawa et al., 2000) y mediante el entendimiento de los transportadores y las afecciones que tiene una planta cuando está expuesta a altas concentraciones de Na^+ , se puede construir un modelo integrativo que ayudara a estrategias biotecnológicas para el mejoramiento a la tolerancia a la salinidad en plantas de importancia agrícola (Bronwyn *et al.*, 2007).

1.6.1 Organismos modificados genéticamente para el mejoramiento de suelos

Recientemente se han obtenido plantas transgénicas para incrementar la tolerancia a estrés abiótico. Los genes que se han utilizado incluyen a los que codifican para enzimas y síntesis de compuestos orgánicos compatibles como el manitol y poliaminas, que contribuyen a la osmorregulación (Pandey *et al.* 2011).

Un transgénico o también conocido como organismo genéticamente modificado (OMG) contiene en todas sus células material genético artificialmente introducido. Para obtener un transgénico se requiere de un protocolo específico (Fig. 4).

Inicialmente, se identifica la problemática o las necesidades que justifiquen el desarrollo del transgénico, se localiza el gen o genes que corresponda a la característica que se desea introducir o eliminar, se construye el vector de transformación en el cual también debe ir incluido un gen de selección con el propósito de distinguir y propagar las células transformadas de las no transformadas; se procede a realizar la transformación de las células vegetales ya sea por técnicas físicas como la biobalística o biológicas como por ejemplo la introducción de plásmidos con el gen de interés en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* que luego sirve para infectar la planta de interés hasta que se integre el plásmido de la bacteria en las células de la planta. El siguiente paso es el crecimiento y regeneración del tejido vegetal transformado mediante un sistema de regeneración *in vitro* apropiado o por transformación de meristemos, las plántulas desarrolladas serán evaluadas para conocer cuántos eventos de transformación (No. de copias de la construcción en la célula) sucedieron y si la inserción se transcribe y traduce a una proteína. Finalmente se evalúa la funcionalidad de la transferencia génica primero en laboratorio, luego en invernadero y finalmente en campo (Quiroz *et al.*, 2012).



Figura 4. Transformación de la planta de tabaco en medio *Agrobacterium tumefaciens*. Imagen modificada de Alberts *et al.*, 2014.

En plantas transgénicas de tomate se han descrito varios genes que codifican para enzimas que confieren tolerancia a estrés osmótico o por déficit hídrico. Entre ellos se encuentran los genes *BADH-1* (betaína aldehído dehidrogenasa), *TPS1* (trehalose-6-phosphato sintasa) (Amudha y Balasubramani, 2011) y de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* *P5CS* (Δ^1 -pirrolina-5- carboxilato sintasa), *5PTse* (inositol 5 polifosfatasa tipo I) y *mt1D* (manitol-1-fosfato dehidrogenasa) y los que sobreexpresan la osmotina (proteína que actúa contra patógenos) (Khare *et al.*, 2010). Sin embargo las plantas con estos genes a menudo presentan algunos cambios pleotrópicos (diferente coloración o tamaño en frutos) indeseables en su morfología y rendimiento agrícola (Amudha y Balasubramani 2011).

En otros estudios también en plantas transgénicas de tomate tolerantes a la salinidad, se insertó el gen *AtNHX1* de *Arabidopsis thaliana*, que codifica para canales de la vacuola de Na^+/H^+ ; estas plantas fueron capaces de crecer y de desarrollar frutos en condiciones salinas (NaCl), a pesar de que en hojas se detectó una elevada concentración de sodio, los frutos presentaban una baja cantidad de sodio. En contraste, lo que se obtuvo mediante mejoramiento genético convencional en donde se integran múltiples caracteres para obtener cultivos tolerantes bajo estas condiciones, usando la misma tecnología se logró el objetivo de la adición de un solo carácter (Zhang *et al.*, 2001).

1.7 *Debaryomyces hansenii* aplicaciones biotecnológicas en la agricultura

Debaryomyces hansenii, es una levadura extremo tolerante al sodio, ya que puede crecer en un medio sin sales y en un medio hasta una concentración de NaCl 4M y pH alcalinos (Prista *et. al.*, 1997). Estas características han desencadenado diversas investigaciones que demuestran que esta levadura crece con mayor velocidad en concentraciones de NaCl o de KCl 1M.

Dado que es una de las levaduras más comunes en ambientes salados y puede tolerar una salinidad de hasta un 25%, esta característica hace que este organismo de enorme interés para el estudio de la tolerancia al sodio y en consecuencia sus posibles aplicaciones en la medicina y la agricultura (Butinar *et. al.*, 2005).

2 Antecedentes

Calderón-Torres *et. al* (2006) realizaron estudios en *D. hansenii* en búsqueda de genes de respuesta al estrés salino y crecieron a la levadura en un medio con NaCl 2M y reportaron que el ARN mensajero del gen *ARO4* aumentaba hasta dos veces con respecto al control. En este trabajo se concluyó que este gen es una respuesta al estrés hipersalino. Posteriormente Calderón-Torres *et. al* (2011) determinaron que también aumentaba la actividad específica de la enzima *DhAro4p*, pero sin la producción aparente de tirosina, ya que demostraron que este aminoácido es rápidamente oxidado a 3-nitrotirosina y propusieron que este mecanismo le permite a la levadura disminuir los efectos del estrés oxidante que se genera durante su crecimiento en una condición de estrés salino. Por ello este grupo de trabajo decidió transformar a la planta *Nicotiana tabacum* con el gen *DhARO4* y evaluar si durante el crecimiento de la planta en estrés salino, el gen *DhARO4* le confería una ventaja de crecimiento a la planta.

Campo *et. al.*, (2014), trabajaron con plantas OMG de arroz, que fueron transformadas con un gen que proporcionaba resistencia a sales, las cuales fueron sometidas a un estrés de NaCl al 60 mM y un estrés por sequía durante 25 días. Sus resultados indicaron que el Na⁺ se concentró en menos proporción en raíz en las plantas modificadas y se reportó que en las plantas Wild type, presentaron severos daños en el crecimiento y desarrollo. También reportaron que la sobreexpresión de este gen mejora la resistencia a estrés oxidante, disminuyendo la peroxidación lipídica.

Kaye *et al.*, 2011 modificaron la planta *Arabidopsis* con 5 genes de tolerancia al estrés por sales y la sometieron a 5 riegos de NaCl en el cual el riego máximo fue hasta NaCl 180 mM y observaron que los genes que le proporcionaron a la planta, lograban reducir las especies reactivas de oxígeno y proporcionaba tolerancia a la planta bajo estrés por NaCl.

En otros trabajos se han hecho esfuerzos por conseguir plantas OMG que tengan un rendimiento adecuado en la agricultura, como por ejemplo Turan y Col. (2009)

investigaron el efecto del NaCl sobre el crecimiento, resistencia estomática, prolina y concentración total de clorofila en cultivos de maíz bajo condiciones de invernadero, sin embargo sus resultados indicaron que las plantas modificadas no tenían parámetros exitosos como lo esperaban, ya que encontrando que el peso seco de las plantas disminuyó al igual que el contenido total de clorofila, mientras que aumentaron el contenido de prolina y la resistencia estomática.

En otro trabajo sobre plantas OMG, Akça y Samsunlu (2012) investigaron los efectos de la salinidad del agua de riego sobre el contenido de clorofila (entre otras variables) en tres cultivos de nogal, encontrando una disminución del crecimiento de las plantas y del contenido de las clorofilas a y b en condiciones de salinidad elevada. Los contenidos de clorofila a y b, prolina y sodio en relación a los diferentes niveles de salinidad mostraron diferencias significativas, mientras que el contenido de clorofilas entre cultivares no presentaron diferencias significativas.

3. Justificación

La salinidad en suelos agrícolas ha sido una de las principales limitantes con respecto al crecimiento de especies en cultivos agrícolas, si la modificación de *Nicotiana tabacum* con un gen en respuesta al estrés salino (*DhARO4*) mejora el crecimiento de la planta bajo condiciones de estrés, esto sería una solución a esta problemática del acelerado proceso de salinización de suelos.

4. Hipótesis

Si el gen *ARO4* de la levadura halotolerante *D. hansenii* es una respuesta antioxidante en condiciones de estrés salino por NaCl 2 M; entonces la planta *Nicotiana tabacum* ya modificada con el gen *DhARO4*, será tolerante al riego con una concentración de NaCl 100mM, sin que se modifique su crecimiento.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general

- Evaluar el crecimiento de la planta *Nicotiana tabacum* modificada con el gen *DhAro4* y la planta control WT, bajo condiciones de estrés salino.

5.1.1 Objetivos particulares

-Determinar los parámetros morfológicos de crecimiento y evaluar si estos tienen alguna diferencia significativa.

-Determinar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ERO) mediante el ensayo de 2'7'diclorohidrofluoroceína y comparar el nivel de estrés oxidante en hoja, tallo y raíz.

- Determinar la concentración de los iones solubles: Na⁺ y K⁺ en raíz, hoja, tallo y suelo para comparar la cantidad de Na⁺ y K⁺ que retienen en cada parte de la planta.

-Determinar y comparar la concentración de clorofilas totales, a y b, con estrés por NaCl 100 mM y sin estrés.

6. Materiales y métodos.

6.1 Análisis del suelo

La calidad y la composición del suelo utilizado en la germinación de *Nicotiana tabacum* se analizó en el laboratorio de Edafología ubicado en la Unidad de Biotecnología y Prototipos en la Facultad de Estudios Superiores Iztacala con el método para determinar cationes solubles, desarrollado por Cheng y Bray (1951) y posteriormente modificado por la U S Salinity Laboratory Staff (1954) citado en el manual de métodos de análisis de suelos. En la tabla I se muestra el reporte del análisis del suelo.

Tabla I, Composición de los elementos principales de la tierra empleada en el cultivo de *Nicotiana tabacum*.

Ca⁺⁺ intercambiable	Mg⁺⁺ intercambiable	Na⁺ intercambiable	Nitrógen o Total %	Fósforo asimilable ppm	Potasio intercambiable
3626*	231*	128*	0.396	2.93	294*

* Los valores de concentración están en milimoles por kilogramo de tierra.

6.1.2 Verificación de la presencia del gen *DhARO4* en la planta *Nicotiana tabacum*

Previo a la germinación y crecimiento de las plantas OMG, el grupo de trabajo a cargo de la Dra. C. Marissa Calderón, llevó a cabo la extracción del ADN genómico de la levadura *Debaryomyces hansenii*, de la planta *Nicotiana tabacum* cepa silvestre (WT) y de la planta OMG y con los oligonucleótidos de anclaje que corresponden al gen, al promotor y la secuencia del gen se amplificaron mediante una reacción en cadena de la Polimerasa (PCR), los resultados de la amplificación de PCR se presentan en la figura 5.

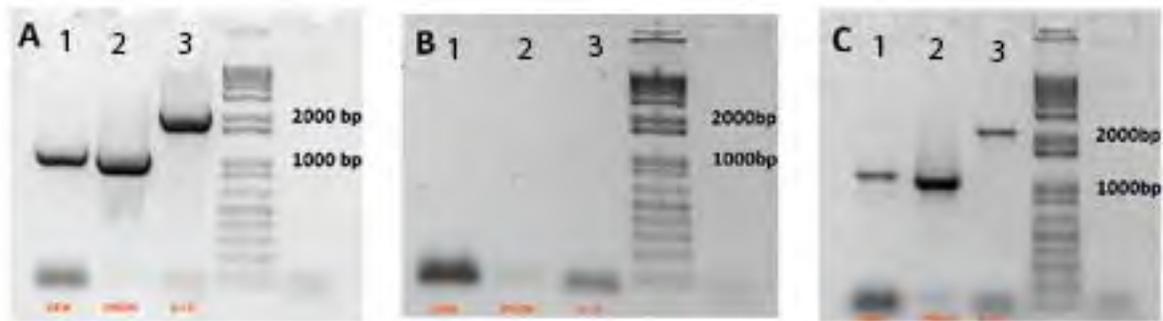


Figura 5. Presencia del gen *DhARO4* de la levadura *D. hansenii* en *N. tabacum*. Amplificación por PCR del gen *DhARO4*: A) En *D. hansenii* banda de 1107 pb (carril 1), Promotor de 850 pb (carril 2) y Gen+Promotor de 1957 pb (carril 3), B) En la planta *N. tabacum* wildtype y C) En *N. tabacum* transformada con el gen *DhARO4*.

6.2 Material vegetal.

6.2.1 Germinación plantas de tabaco transgénica (Generación F1) y silvestre (WT).

El material vegetal utilizado para la experimentación del presente proyecto fue germinado en suelo previamente esterilizado y crecido en el Jardín botánico de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala en los meses de Septiembre-Octubre de 2016, en la germinación, se tomaron 20 semillas de cada una de las dos líneas: tratamiento (Línea transgénica generación F1) y control (planta silvestre WT), las cuales para una germinación más rápida se utilizó un método de escarificación química, que consistió en añadirles una solución de hipoclorito de sodio al 4% y enjuagarlas inmediatamente con agua destilada en un filtro de 10 μ m de diámetro. Posteriormente las semillas se sembraron en contenedores de polietileno transparentes de 25 x 25 cm, los cuales previamente fueron preparados con tierra compuesta de sustratos orgánicos (hojarasca, polen, pasto, etc.) con un tamaño de partícula fino, que se obtuvo en un tamiz de 3mm de diámetro y con una humedad del 30%; después de colocar las semillas, se les añadió una capa fina

de tierra. Por último cada recipiente se roció con agua purificada baja en sales hasta obtener una humedad del 50 al 60% y se sellaron con tapas herméticas. Las cajas se mantuvieron en condiciones de invernadero, es decir a 25°C con humedad relativa de un 35% y un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas cada uno.

6.1.2 Trasplantación.

Después de 3 semanas de la germinación se seleccionaron las plántulas que brotaron y que alcanzaron los 5 a 6 cm de altura. Estas fueron transplantadas en vasos de plástico con tierra filtrada en un tamiz de 1 cm de diámetro. En primer lugar, la raíz de cada plántula se lavó con agua purificada y a la raíz se le espolvoreó azufre (S) para el metabolismo del nitrógeno. Cada una de las plántulas transplantadas fue cubierta con plástico delgado previamente perforado.

6.2 Diseño experimental.

Para el riego de las plantas, estas se dividieron en dos grupos; el primer grupo consistió de las plantas control (WT) y transformadas con el gen *DhARO4* (OMG) regadas con un volumen de 50 ml de agua potable baja en sales con una n=5 plantas por cada tratamiento. En el segundo grupo, las plantas control y transformadas fueron regadas con el mismo volumen pero de una solución de NaCl 100 mM de igual manera con una n=5. El riego de los dos grupos se realizó cada tercer día.

6.3 Procesamiento de las muestras.

6.3.1 Colecta

Después de 52 días de crecimiento contados a partir del trasplante, las partes de las plantas (hoja, tallo y raíz) fueron cortadas y congeladas inmediatamente con nitrógeno líquido y almacenadas en tubos de 1.5 ml de volumen a menos 70°C.

6.3.2 Evaluación de especies reactivas de oxígeno (ERO).

La evaluación se llevó a cabo a partir de extractos celulares, los cuales fueron preparados como a continuación se describe, de cada tejido de la planta (hoja, tallo, raíz) se tomaron 0.010 gramos, y se lavaron con 300 µl de buffer salino de fosfatos (por su significado en inglés phosphate buffered saline PBS) a una concentración 1x; para la lisis celular fue agregado 3 µl de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 100 mM y las muestras se homogenizaron con un micropistilo de teflón; posteriormente las muestras fueron centrifugadas en frío a 4 °C a 13,000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se recuperó en un tubo de 1.5 ml nuevo y se mantuvo en hielo a 4 °C .La determinación de ERO se hizo en una placa de 96 pozos de pared oscura y fondo transparente, a cada pozo se le añadió lo siguiente: 230 µl de PBS 1x, 15 µl de muestra y 5 µl de diclorohidrofluoresceína (DFCHA) 500 µM. Como controles positivos de oxidación, se utilizó peróxido de hidrógeno, con un gradiente en porcentaje (volumen/volumen) de 5, 10, 20 y 50 µl y se aforó a 245 µl con buffer PBS 1X y 5 µl de DFCA, así como un control negativo con 245 µl de PBS 1 y 5 µl de DFCHA.

Las lecturas de las muestras se realizaron en un espectofluómetro (Biotek) con lector de placas de 96 pozos a 485 nm de excitación y 520 nm de emisión, las muestras se agitaron cada 10 minutos hasta llegar al minuto 60. Las lecturas de fluorescencia obtenidas fueron ponderadas con la concentración de proteínas totales de cada muestra y se expresaron en unidades relativas de fluorescencia por gramo de proteína.

6.3.3 Proteínas totales.

La concentración total de proteínas en cada muestra se hizo con el método de absorción UV a 280 nm (Olson y Markwell 2007) y una curva estándar de concentración de albumina de suero bovino (BSA por sus siglas en inglés), la tabla de contracciones de BSA se muestra en el anexo 1. En la determinación de las muestras se hizo un dilución de 10 µl de muestra en 990 µl de agua desionizada para poder aforar la cubeta del lectura a 1ml. Las lecturas se realizaron en un espectro de luz visible y UV.

6.3.4 Determinación de iones solubles: Na⁺ y K⁺.

Suelo. La determinación de iones solubles en suelo, se llevó a cabo partiendo del protocolo establecido por El Departamento de Agricultura de Estados Unidos en 1993 (por sus siglas en inglés USDA) y citado en el Manual de Edafología editado por la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (Muñoz et al., 2015). De cada vaso donde crecieron las plantas, de tomaron 10 grs de muestra de tierra del grupo 1, (plantas regadas con agua potable) y del grupo 2 (tierra regada con agua potable + 100mM de NaCl), la muestra de tierra se colocó en tubos falcón con 10 ml de agua destilada y milli Q. Los tubos fueron sellados y agitados en vortex por 30 segundos, después se centrifugaron a 5000 rpm durante 10 min. Pasado ese tiempo, el sobrenadante se recuperó y de cada tubo se hizo una lectura en un flamómetro que tiene un sistema de fotometría de flama, como referencias se utilizaron dos soluciones de sodio y potasio 1 mM.

6.3.5 Hoja, tallo y raíz

En la determinación de Na⁺ y K⁺, se utilizó el protocolo para levaduras con pared celular gruesa (González-Hernández *et al.*, 2004). Una fracción de tejido de la misma muestra que se utilizó en la medición de ERO, se deshidrató en un horno de secado por 48 hrs. a 80°C, posteriormente el tejido se pesó en una balanza analítica y se colocó en tubos de ensaye y se le añadió 10 ml de agua destilada y milli Q, luego se incubó en baño maría hasta la ebullición del agua (ciudad de

México 100°C) durante una hora (, después cada tubo se centrifugo a 4000 rpm durante 10 minutos; el sobrenadante se recuperó en otro tubo falcón limpio. Con este sobrenadante se hicieron las lecturas en un flamómetro. Los resultados obtenidos de la lectura se convirtieron a mmoles/ml de sodio y potasio y se multiplicaron por el peso seco obtenido por cada tubo.

Cuantificación de clorofilas.

Se tomarán 0.5g de tejido el cual se macerará con 5ml de acetona al 90% disgregando el tejido vegetal en un mortero, de modo que los pigmentos salgan al exterior y se disuelvan en acetona. Cuando el tejido se integre bien a la acetona, el macerado se introducirá en un tubo falcon y se centrifugará a 2000 rpm por 10 minutos. Se recuperará el sobrenadante verde y se ajustará a un volumen de 6ml con acetona al 80%. Para las mediciones de clorofila en el espectrofotómetro se tomarán 0.5ml de muestra y volverá a diluir con 5 ml de acetona al 80%. Las mediciones se realizarán con una longitud de onda entre los 645 y 663nm (Rivera C., *et al* 2005).

6.4 Análisis estadístico.

Con los datos obtenidos de fluorescencia relativa, concentración de iones solubles, clorofilas totales y parámetros morfológicos se obtuvo la media (n=5) y su desviación estándar, para determinar diferencia entre los tratamientos y el control se realizó un análisis estadístico no paramétrico *t* de *Student* de muestras no pareadas con un valor de significancia $p < 0.05$ y una análisis de varianza ANOVA con una $p < 0.05$.

7 Resultados.

7.1 Parámetros morfológicos.

En el día 52 de crecimiento se hizo la colecta de cada planta y se determinaron parámetros de crecimiento como: la longitud del tallo, tamaño de la hoja y número de hojas.

Los resultados en la longitud del tallo, las plantas OMG regada con agua sin sales y con NaCl fueron significativamente menor con respecto a la WT en estos dos tratamientos; en el tamaño de la hoja, en el largo y ancho se observaron diferencias significativas en los dos grupos OMG y WT regados con agua baja en sales y con NaCl 100 mM. Por último en el número de hojas, se observa que las plantas OMG cuentan con mayor cantidad con respecto a las plantas WT, en este caso no se observan diferencias significativas.

Es importante mencionar que para esta fecha, las plantas de tabaco no han alcanzado la etapa de mayor crecimiento por lo que ninguna planta presentó inflorescencia, por lo tanto no se cuenta con el número de flores y número de semillas. Los resultados se muestran en las figuras 6 y 7.

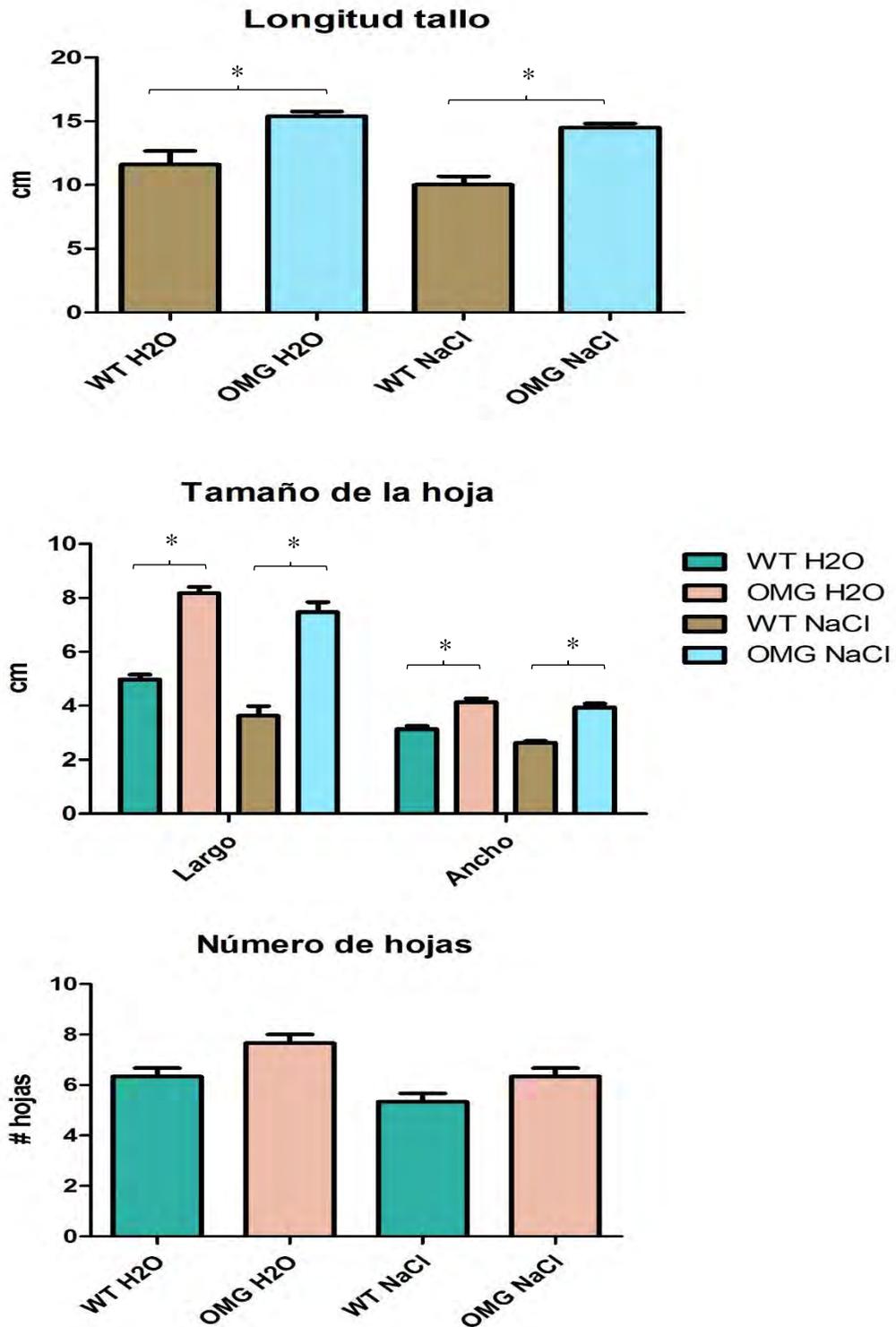


Figura 6. Parámetros morfológicos: Longitud del tallo, tamaño de las hojas y número de hojas. *: Diferencia significativa $p < 0.05$. Los resultados son expresados como media \pm SEM (n=3).

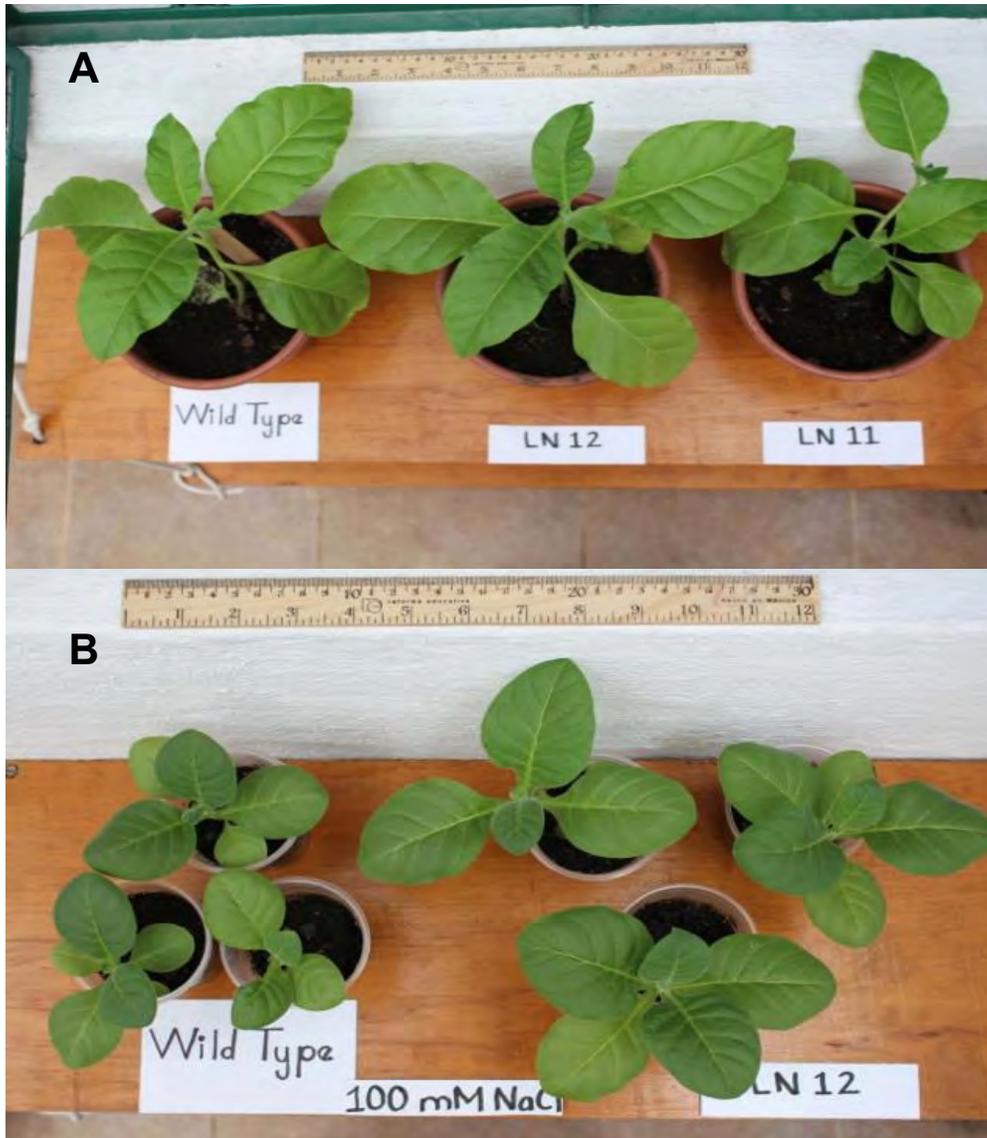


Figura 7. Plantas de tabaco con 58 días de crecimiento. A) plantas regadas con agua sin sales. **B)** Plantas regadas con NaCl 100mM.

7.1 Parámetros bioquímicos.

7.1.1 Especies Reactivas de Oxígeno.

En las plantas control y tratamiento se determinó la producción de especies reactivas de oxígeno. Los resultados se muestran en la figura 8 y el análisis estadístico se describe en el anexo 2.

Hoja

Los niveles de ERO totales en la hoja de la planta silvestre regada con agua y con sodio son menores a los de la hojas de las plantas modificadas (OMG). Con la prueba de tukey se observa que la planta OMG regada con NaCl 100mM presenta una diferencia significativa con respecto a la WT regada con agua sin sales y con la planta OMG bajo esta misma condición.

Tallo

En el tallo, los niveles de ERO totales fueron menores en la planta WT en comparación a las plantas modificadas (OMG) cuando se regaron con agua sin sales. Sin embargo en ambas plantas cuando fueron regadas con la solución de NaCl 100 mM los niveles de ERO fueron similares. Estadísticamente se observan diferencias significativas con la prueba tukey entre las plantas WT H₂O vs OMG NaCl.

Raíz

Por lo que respecta los valores de ERO en la raíz, se muestra que cuando las plantas WT y OMG fueron regadas con agua dulce, la planta WT tiene menor producción de ERO; pero ocurre lo contrario cuando ambas plantas son regadas con NaCl 100 mM, ya que la raíz de la planta WT presenta el mayor nivel de ERO. Aplicando la prueba de tukey en los tratamientos se muestran diferencias significativas en plantas WT regadas con agua dulce con respecto a las plantas WT con riego de NaCl 100 mM y las plantas OMG regadas con agua sin sales con OMG regadas con NaCl 100 mM.

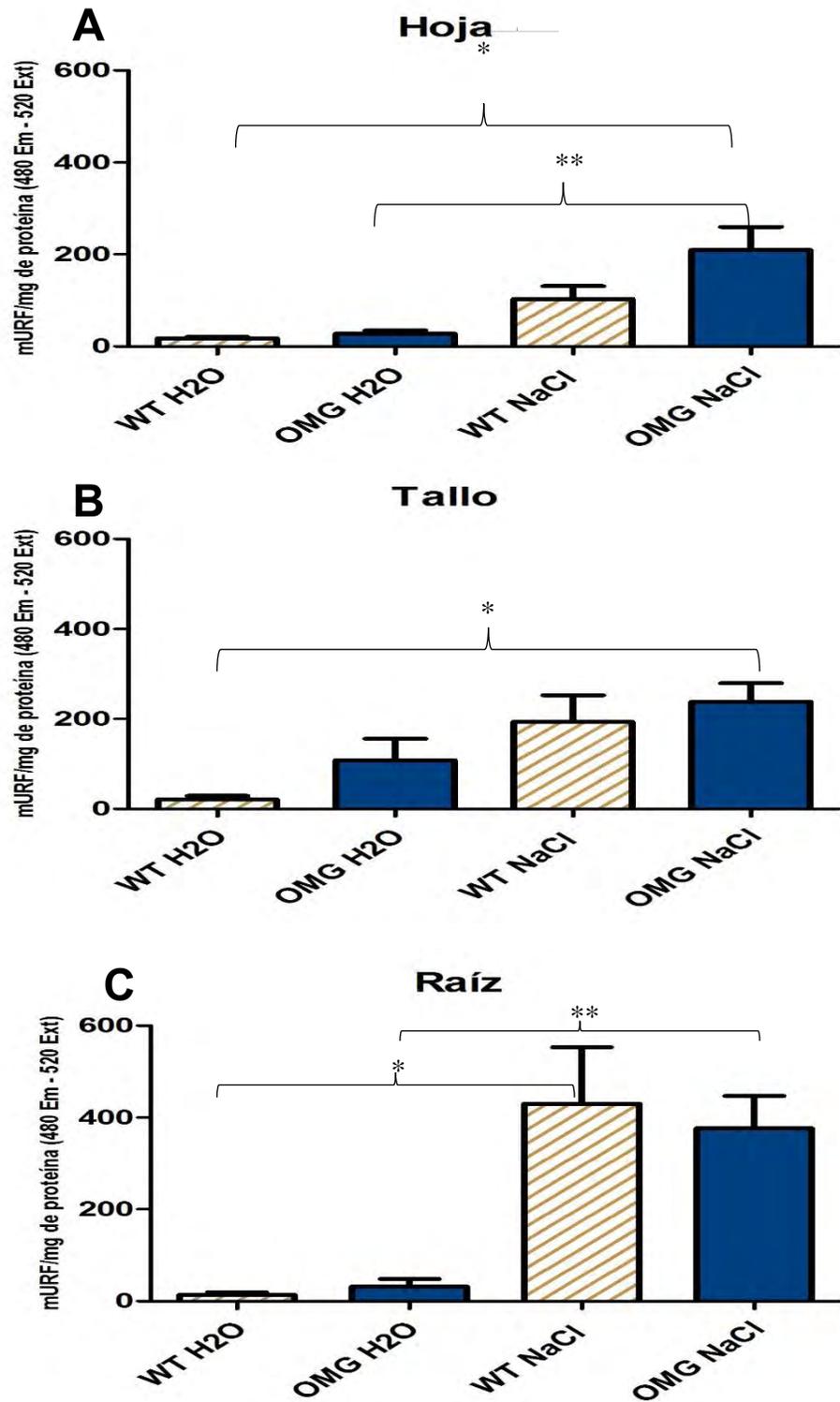


Figura (8). Especies reactivas de oxígeno. Concentración de ERO en Hoja **A**. Concentración en Tallo **B**. Concentración en Raíz **C**. *: diferencia significativa $p < 0.05$ con la prueba de tukey. Los resultados son expresados como media \pm SEM (n=5).

7.1.2 Iones solubles

Las mediciones de iones solubles Sodio (Na^+) y Potasio (K^+) en hoja, tallo, raíz y tierra, se determinaron de acuerdo al protocolo para levaduras de pared gruesa (González-Hernández et al., 2004), los resultados de este protocolo fueron consistentes con los resultados que obtuvimos del protocolo convencional que emplea una digestión ácida seguida de una ebullición. Aunado a lo anterior es importante mencionar que el protocolo convencional de digestión ácida es adecuado cuando se determina la concentración de cationes divalente como el calcio.

A continuación se describen los resultados de la determinación de los iones sodio y potasio (Figura 10), comenzando por el contenido de Na^+ y se desglosa cada parte de la planta, seguido de la descripción del contenido de (K^+). Por último se muestran las mediciones en tierra. De lo anterior mencionado, en cada apartado se indican los resultados significativos de la prueba estadística *t* de *Student*, mientras que los resultados no significativos de la prueba de ANOVA no paramétrico se muestran en el anexo 3.

Na^+

Hoja

En la figura 7 parte A, se observa que la planta WT tiene una mayor retención de sodio en comparación con la planta OMG cuando ambas son regadas con agua dulce. Esta tendencia al aumento de Na^+ en la hoja de la planta WT se mantuvo cuando es regada con NaCl al 100mM, es decir que los niveles de Na^+ siempre fueron mayores en la hoja de la planta WT.

Tallo

En la misma figura en la parte B, observamos que la concentración de Na^+ en el tallo es mayor en plantas WT cuando son regadas con agua sin sales; de manera contraria se presenta en las plantas que fueron regadas con NaCl 100Mm y en este tratamiento la planta que presentó mayor retención de Na^+ fue la OMG.

Raíz

Por último, en los tejidos de raíz, se observa una tendencia de mayor retención de sodio en las plantas WT regadas con agua sin sales y NaCl 100 Mm, mientras que la raíz de la planta OMG tiene niveles menores del contenido de sodio. Ningún tratamiento mostró diferencias significativas.

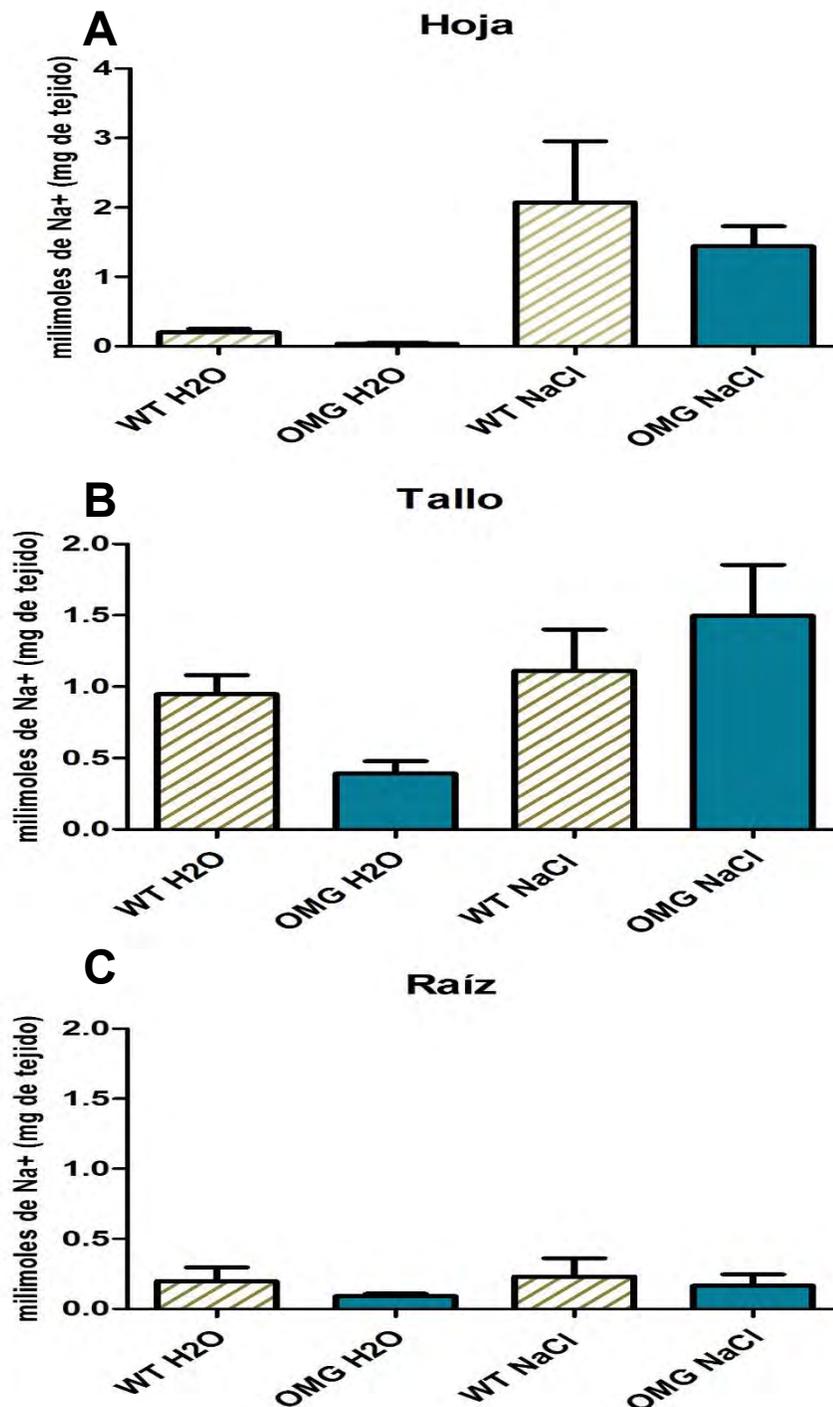


Figura (9). Iones solubles sodio (Na⁺). A) Concentración de Na⁺ en Hoja. B) Concentración en Tallo y C) Concentración en Raíz. Los resultados son expresados como media \pm SEM (n=5).

K+

Hoja

En la figura 10, en el panel A se muestra que las concentraciones de K⁺ en las dos plantas WT y OMG es similar cuando ambas plantas son regadas con agua sin sales y con NaCl 100 mM, pero aunque son similares los valores de potasio, en la hoja de la planta OMG se observa que hay ligero aumento de los niveles de potasio.

Tallo

En el tallo los niveles de K⁺ (Figura 8 panel B), se observa la misma tendencia que en la hoja, es decir que en el tallo de la planta OMG hay un mayor nivel de sodio cuando es regada con agua sin sales y con una solución de NaCl 100 mM.

Raíz

En este tejido, encontramos que la planta WT tiende a acumular una menor cantidad de potasio, al ser regadas con agua sin sales y NaCl 100 mM. La planta OMG es la que tiene mayor concentración de potasio especialmente en el tratamiento de agua sin sales.

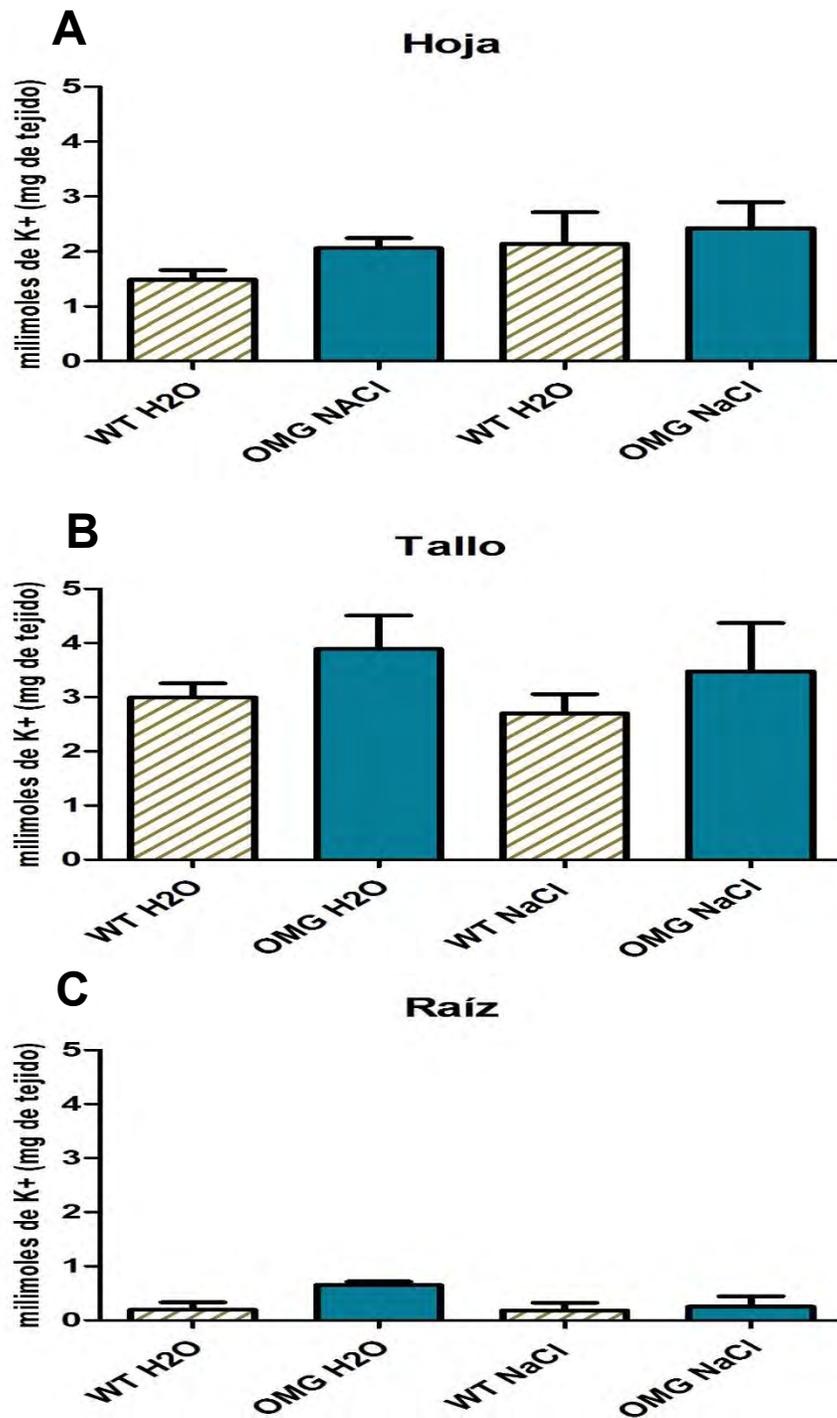


Figura (10). Iones solubles potasio (K⁺). Concentración de K⁺ en Hoja **A**. Concentración en Tallo **B**. Concentración en Raíz **C**. Los resultados son expresados como media \pm SEM (n=5).

Suelo

Na⁺

En la figura 11 panel A, se puede observar que la concentración de Na⁺ en el suelo donde crecieron las plantas WT y que fueron regadas con agua dulce, fue mayor el contenido de sodio, con la prueba *t de student* se corroboró que el aumento es significativo, es decir el suelo donde crecieron las plantas WT tenía más sodio que el de las plantas OMG ($p=0.0102$). Por el contrario, en el suelo de las plantas WT y OMG regadas con agua+NaCl 100 mM, el sodio fue mayor en la tierra de las plantas OMG, esto significa que las plantas OMG no están absorbiendo tanto sodio como las plantas control o WT. Con la prueba de ANOVA, se encontró diferencias significativas en el tratamiento OMG NaCl vs WT H₂O Y WT H₂O vs WT NaCl.

K⁺

En la figura 11 en el inciso B, se observó que el suelo donde estuvieron creciendo las plantas WT y que fue regada con agua dulce, presenta una mayor concentración de potasio y es significativamente menor con respecto a la tierra donde crecieron las plantas OMG bajo este mismo riego. Por otra parte, en la tierra de las plantas OMG que fueron regadas con NaCl 100 mM, se observa la misma tendencia de una mayor concentración de potasio y es significativamente mayor en comparación a la tierra donde fueron crecidas las plantas WT, es decir que las plantas OMG tienden a asimilar una mayor cantidad de potasio que las plantas WT.

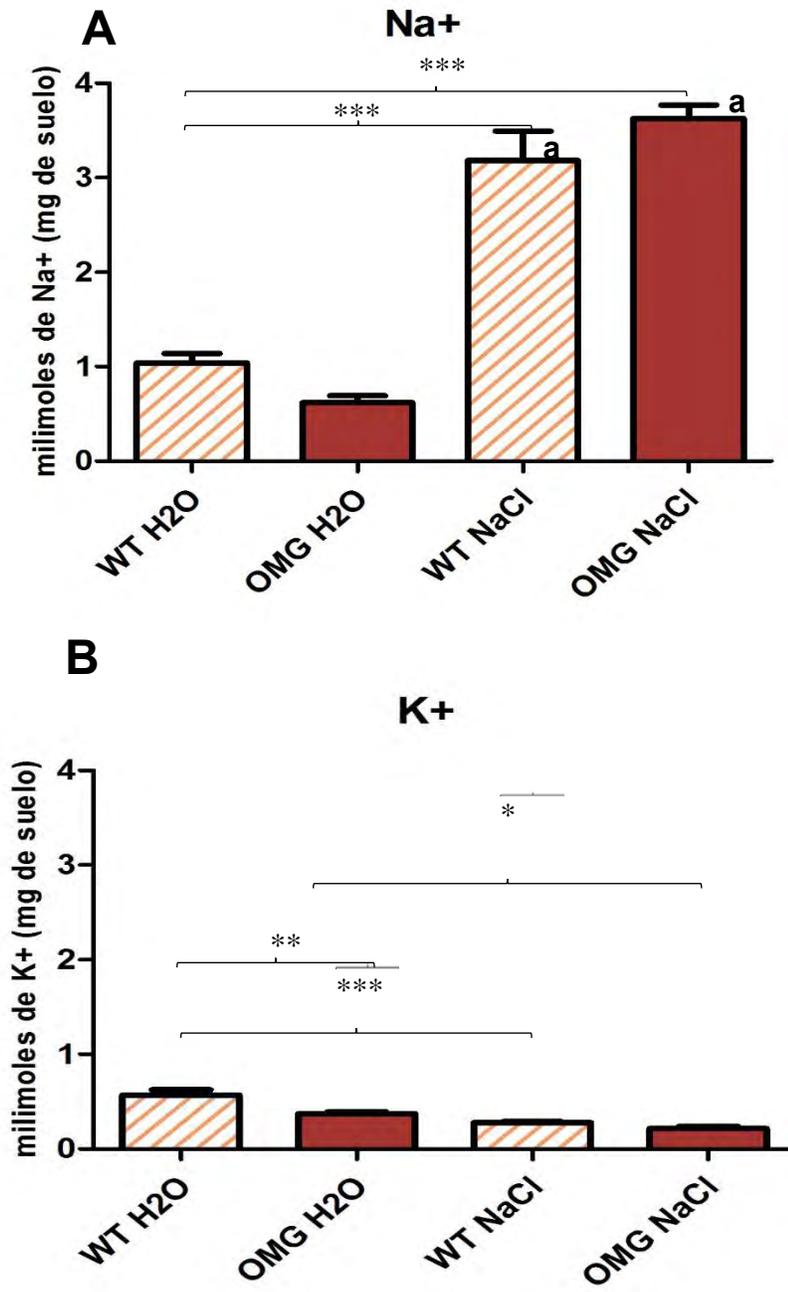


Figura (11). Iones solubles sodio (Na⁺) y potasio (K⁺). Concentración de Na⁺ en Tierra **A**. Concentración K⁺ en tierra **B**. *: diferencia significativa p <0.05. ***: Diferencia significativa p<0.001.. **a**: diferencia significativa p<0.001 con la prueba t de student. Los resultados son expresados como media ±SEM (n=5).

7.1.3 Concentración de clorofilas (totales, a y b)

Los resultados del contenido de clorofilas, se describen a continuación y se presenta su respectivo gráfico en la figura 12.

Clorofilas totales

El contenido de clorofilas totales es ligeramente mayor en la planta OMG (259.89 mg/PF) en comparación de la WT (249.93 mg/PF); sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos.

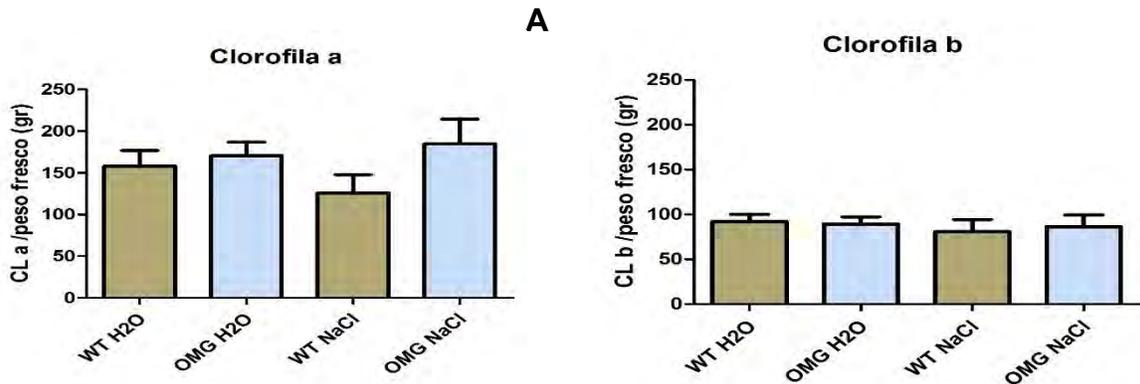
Clorofilas a

Este pigmento se presenta en mayor concentración en las hojas de planta OMG, en los dos tipos de riego, ya que en las plantas OMG regadas con agua dulce la concentración de clorofilas a es de 170.46 mg/PF contra el valor menor de la planta WT de 157.96 mg/PF. Por otra parte, en el tratamiento de riego con sodio, aunque se logra observar que las plantas OMG llevan una ventaja en el nivel de pigmento (184.61 mg/PF) contra WT (125.90 mg/PF), este no presenta alguna diferencia significativa.

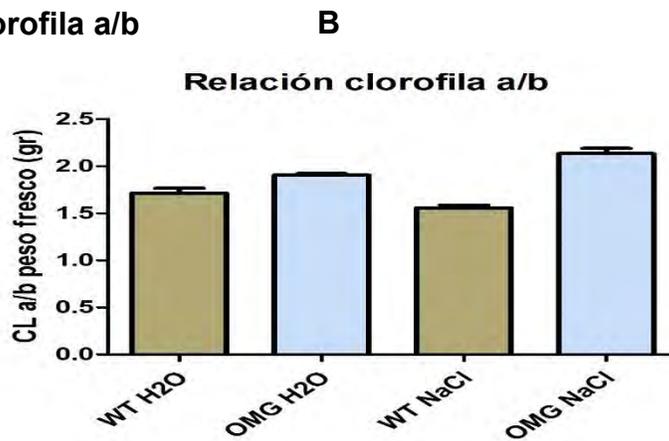
Clorofila b

En cuanto a la concentración de clorofila b se encuentra que no hay una diferencia entre los tipos de plantas, aunque la clorofila b en el tratamiento control es ligeramente mayor en la WT (91.88) vs OMG (89.34); pero en el tratamiento experimental, vuelve a tomar ventaja en la planta OMG (86.31) vs WT (80.76). En ninguno de los dos tratamientos se muestran diferencias significativas.

Clorofilas a y b



Relación clorofila a/b



Clorofilas totales

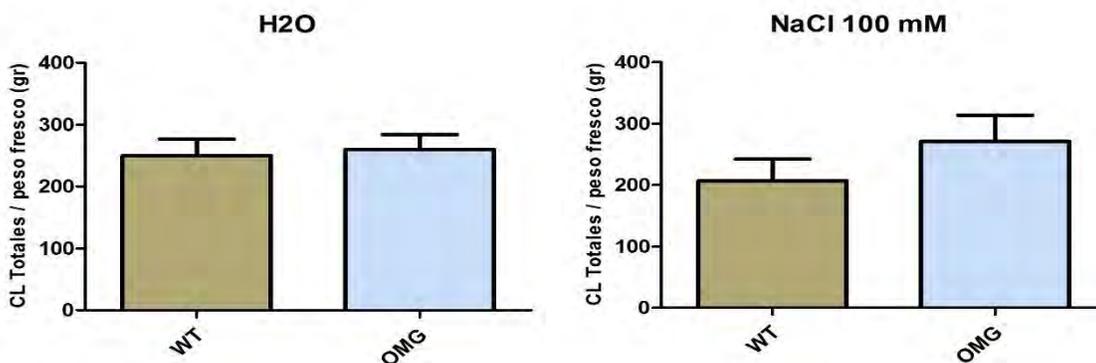


Figura (12). Clorofilas: a y b, relación clorofila a/b/ y clorofilas totales. Concentración de clorofilas a y b **A**. Relación clorofila a/b **B**. Concentración de clorofilas totales **C**. Los resultados son expresados como media \pm SEM (n=3).

8. Discusión

El objetivo del presente trabajo fue la evaluación del crecimiento en estrés salino de la planta de *Nicotina tabacum* modificada con el gen *DhARO4* de la levadura *Debaryomyces hansenii*. Se ha reportado que cuando la levadura es crecida en estrés salino ocurre estrés oxidante secundario, debido a que aumentan los radicales libres, una de las respuesta que tiene la levadura es la activación de la la transcripción del gen *DhARO4*, ello conduce al aumento de la enzima *DhAro4p* que participa en la síntesis de tirosina, la tirosina sintetizada sirve como antioxidante que reacciona con los radicales libres y así la levadura evita el daño de las biomoléculas (Calderón-Torres *et al.*, 2011). Considerando que en la levadura el gen *DhARO4* reduce daños por estrés oxidante y le permite su crecimiento en presencia de sodio, en el presente trabajo se evaluó el crecimiento de la planta *Nicotiana tabacum* modificada con el gen *DhARO4* durante estrés salino. A continuación se discuten los resultados de la evaluación de los parámetros morfológicos y bioquímicos de las plantas *Nicotiana tabacum* control y modificada genéticamente cuando son crecidas bajo bajo estrés salino por riego con NaCl 100 mM.

8.1 Parámetros morfológicos y Especies Reactivas de Oxígeno

En cuanto a los parámetros morfológicos (Tabla III) se observó que las plantas WT alcanzaron un menor tamaño que las plantas OMG en cualquiera de los dos tratamientos, es decir cuando fueron regadas con agua dulce o agua+ NaCl 100mM, este menor rendimiento de las plantas WT es acorde a lo reportando, ya que uno de los primeros efectos fisiológicos que provoca el estrés salino es la reducción del crecimiento debido en la capacidad de absorción de agua, esta capacidad de absorción es conducida por dos tipos de estrés de los cuales se vienen mencionando: hídrico y osmótico (Nuñez *et al.*, 2007). Cramer *et. al.* (1990) reportó que plantas de tabaco tipo silvestres, se ha determinado que la salinidad

les puede afectar directamente en la elongación foliar y en consecuencia también en el área foliar y por lo tanto la capacidad fotosintética de la planta y estos mismos autores reportaron que en sus plantas de tabaco la reducción del área foliar por efecto de la salinidad llegando a la conclusión que esto puede deberse a tres factores 1) reducción en la tasa de la fotosíntesis, 2) reducción del aprovechamiento de los carbohidratos o fotosintatos en el crecimiento de la planta y 3) que exista un incremento en la utilización en los fotosintatos para la respiración, por lo tanto genera un mayor escape de e^- en el citoplasma (del Amor *et. al.* 2001; Cramer *et. al.* 1990).

Este escape e^- provoca las interacciones redox que se dan en los compartimentos intracelulares en los organelos como los cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas, los cuales son importantes generadores de ERO, así como especies reactivas de nitrógeno (ERN), siendo estas interacciones una clave en la activación de una respuesta al estrés biótico, abiótico y procesos de desarrollo involucrados en la fotosíntesis, la fotorespiración y la respiración celular (Kleine *et. al.* 2016), llevando así a la célula a un estrés oxidante .

En los resultados de la evaluación de la producción de ERO, solo se encontraron diferencias significativas entre las plantas (OMG y WT) regadas con agua dulce contra las plantas regadas con NaCl 100mM, sin embargo, se observó que las plantas OMG tuvieron el nivel más alto de ERO con este último riego y particularmente en la hoja se observaron los niveles más altos, este resultado es contrario a los parámetros fisiológicos anteriormente mencionados ya que las plantas OMG tuvieron mayor tamaño que las WT. Se ha reportado que en las hojas hay una interacción importante entre los peroxisomas, mitocondrias y cloroplastos, en donde los peroxisomas convierten el glicolato, formado en la fotosíntesis en glicoxalato, pero un porcentaje de glicolato es convertido a H_2O_2 en los peroxisomas por la acción de la glicolato oxidasa; también los glioxisomas, otro tipo de peroxisomas, se caracterizan por la presencia de una serie de enzimas que llevan a cabo el ciclo del glioxilato y al igual que en los peroxisomas también hay producción de H_2O_2 (Reumann y Weber, 2006).

Por otra parte, en la raíz de la planta OMG con riego de NaCl 100mM, fue la parte de la planta que presentó mayor cantidad de ERO, pero fue menor con respecto a las plantas WT con el mismo riego, estos resultados son similares a los ya reportados por Kaye *et al* (2011), donde plantas OMG de *Arabidopsis* con genes que ayudaban a reducir las ERO, mientras más prolongado fuera el estrés con NaCl 150mM, más especies reactivas de oxígeno observaban en las plantas OMG, pero el crecimiento de la planta no se veía severamente afectado.

Bajo estas condiciones de estrés la producción de ERO sobrepasa el potencial antioxidante que desarrolla la planta, llevando sus concentraciones en una cantidad elevada (Garg y Manchanda, 2010). En las hojas disminuye la disponibilidad de CO_2 ligada al cerrado de los estomas, lo que dirige el transporte de electrones hacia la producción de oxígeno molecular generando iones súper oxido y por ende un estrés oxidante (Asada, 2006).

En particular, para el estrés oxidante por salinidad, se ha propuesto que las ERO es un elemento obligatorio de la respuesta para inducir un adecuado proceso de aclimatación, siendo que la acumulación de ERO es el elemento crucial para la resistencia a las plantas bajo estrés salino (Miller *et. al.*, 2006). Una respuesta que se puede tener de el porque las plantas WT presentan niveles más bajos de ERO en condiciones de estrés salino, es porque tienen una respuesta bioquímica para sobreponerse el estrés oxidante. Esta defensa de las plantas incluye las enzimas antioxidantes tales como peroxidasa (Prx), ascorbato peroxidasa (APX), glutatión reductasa (GR), superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), la mono dehidroascorbato reductasa (MDAR), junto con otras enzimas del ciclo ascorbato-glutatión, promotores de la eliminación de ERO (Miller *et al.*, 2009; Pirastén *et al.*, 2012).

Otro grupo de proteínas que se expresan durante estrés hídrico incluye las de choque térmico, las proteínas transportadoras de iones y aquellas que permiten el transporte de agua (acuaporinas), las proteasas, las proteínas kinasas, las fosfatasa, las proteínas involucradas en el metabolismo de los fosfolípidos y los

factores transcripcionales (Shinozaki y Yamagochi 2007). El sistema de defensa bioquímica también incluye carotenoides, ascorbato, glutatión y tocoferol. Otros autores sugieren que la función de azúcares, polioles, glicina betaína y prolina puede ser proteger a las células contra los radicales hidroxilo (Sickler *et al.*, 2007). Una correlación entre la capacidad antioxidante y tolerancia a la salinidad ha sido reportada en tomate en estudios comparativos entre especies cultivadas y silvestres (Foolad, 2007; Zushi y Matsuzce 2009).

Otra repuesta propia de las plantas WT es que se ha reportado cuando el sistema de transporte de la mitocondria es afectado por la salinidad produciendo cantidades elevadas de ERO. El estrés salino y la sequía aumentan la actividad de PmitoK_{ATP} (canal selectivo de K⁺ sensible a ATP situado en la membrana interna de la mitocondria), estos tipos de estrés aumentan la producción del radical superóxido y este a su vez puede estimular a PmitoK_{ATP}, aunque la activación de este puede reducir hasta un 60% la producción de ERO, sugiriendo que la actividad de PmitoK_{ATP}, protege a la mitocondria y a la célula por la producción de ERO bajo estrés salino (Pastore *et al.*, 1999).

Aunque el aumento en la producción de ERO en las plantas puede ser usado para monitorear el estrés intracelular activando respuestas de defensa, los niveles de ERO deben mantenerse bajo un estricto control, debido a que su sobre acumulación puede producir la muerte celular por daño oxidante. En forma alternativa, los niveles elevados de ERO pueden activar una vía de muerte celular programada (MCP), como se demostró recientemente en plantas de tabaco por la inhibición de genes antiapoptóticos inducidos por estrés oxidante (Rivera *et al.*, 2004).

El aumento del tamaño de la planta OMG con un aumento de ERO, derivo en el cuestionamiento de que el proceso genera una mayor concentración de ERO sin que afecte el crecimiento de la planta. Por lo que en el presente trabajo se decidió evaluar el contenido de clorofilas para determinar si esta podría ser la causa de las diferencias observadas en la producción de ERO.

8.2 Clorofilas

Como se observa en la figura 12, las plantas que se regaron con agua dulce WT y OMG se comportan de una manera similar en el contenido de clorofilas totales, a y b; en cambio cuando se encuentran bajo el riego de agua con sales, las plantas que se ven más afectadas son las plantas WT. Observaciones similares se encontraron en el trabajo de Taffouo 2010, que utilizó varios cultivos de tomate y los sometió a estrés salino de manera gradual (50 y 100mM de NaCl), y encontró que se reduce el contenido de clorofilas totales cuando las plantas WT de tomate crecieron con estrés por NaCl 100mM. Este caso en particular se atribuyó a la inducción de sal en el complejo: proteína-pigmento-lípido, debido a la acumulación de diversas sales en la biosíntesis de las clorofilas (Strongonov *et al.*, 1970), debido a que la disminución de la clorofila bajo estrés salino, tiene efectos adversos en la estabilidad de la membrana (Ashraf y Bhatti, 2000).

Además Argente *et al.*(2006) reportaron que en este mismo compuesto proteína-pigmento-lípido se debilita por el efecto de la salinidad en la concentración de los pigmentos se debe fundamentalmente a la destrucción de las cloroplastos y así logra un aumento en la actividad de la enzima clorofilasa (Taffou *et. al.*, 2010)

Se ha reportado que una de las principales respuestas a las plantas al estar sometidas al estrés es el cierre estomático que genera un ligero bloqueo en la fotosíntesis ya que está limitando la entrada de CO₂, sustrato necesario para el ciclo de Calvin. Este genera un bloqueo en la fase de fotosíntesis (fase lumínica) por nula demanda del poder reductor (NADPH) y ATP, dando como resultado la producción de oxígeno, como un consecuente daño a la membrana de los cloroplastos por su alta concentración y facilidad de reacción generando ERO y posterior puede generar una desintegración en los mismos (Appels *et al.*, 1990). Lo anterior correlaciona con la disminución en los niveles de clorofila en las plantas WT.

8.3 Iones solubles

Considerando que uno de los problemas de las plantas crecidas en suelos salinos, es la acumulación de iones al interior de la célula, en este trabajo determinamos la concentración de los iones de Na^+ y K^+ . En relación con hoja, tallo y raíz, las plantas WT que fueron regadas con agua + NaCl , se observó que tienen una concentración elevada de Na^+ en comparación a las regadas con agua dulce. Las plantas WT tienen concentraciones más elevadas de sodio en la hoja y raíz en comparación con las OMG. Estos resultados coinciden con los reportados en Campo *et al.*, 2014, en el cual presentaron plantas de arroz modificadas con un gen que le generaba resistencias al estrés por NaCl , el ion Na^+ se almacenaba de menor cantidad en la raíz, también se ha reportado que como mecanismo de respuesta natural de la planta ante una concentración alta en Na^+ , se desplazará a los iones de Ca^{++} hacia la membrana celular de la raíz y aumentará su permeabilidad, causando la salida del K^+ de las células lo que favorece la entrada del Na^+ (Dood *et al.*, 2010). De igual forma, al ingresar el Na^+ en esta parte de la planta a través de canales de cationes, transportadores o por vía apoplástica, es decir que viaja a través de las células parenquimales, llegando a la endodermis y así se reduce la relación de K^+/Na^+ en el citosol, dando como resultado una toxicidad por el reemplazo de Na^+ por K^+ ya que los sitios de unión de estos dos iones son similares (Chinnusamy *et al.*, 2005).

Con respecto a la parte del tallo en la planta, se puede observar que tenemos una mejor respuesta en la planta OMG, ya que a pesar que el nivel de concentración de Na^+ es más elevado en plantas regadas con agua + NaCl 100 mM, en esta planta se contrarresta con la cantidad de K^+ que contiene. Esto tiene una correlación directa a la cantidad de nutrientes que llegan a transportarse en el xilema; el efecto del Na^+ inhibe procesos de absorción por antagonismo de Na^+ y K^+ (Hu y Schimdhalter 2005).

Como se mencionó anteriormente, la similitud química que tienen el Na^+ y K^+ , conduce a una competencia en los sitios de absorción en la raíz, dando como resultado ante un estrés salino una deficiencia de K^+ . Se requiere grandes cantidades de este catión en las células vegetales, especialmente en el tallo para el metabolismo, osmorregulación, mantenimiento de la turgencia, expansión celular, transporte en el floema, crecimiento, apertura de estomas, tropismo, movimiento celular y funciones enzimáticas, por lo que se requiere una cantidad de concentración de K^+ de 10 a 50 mM y hasta concentraciones de 100mM o más para la síntesis de proteínas (Zhu, 2003; Niu, 1995).

Así mismo las partes de la planta WT que presentaron mayor retención de Na^+ fueron la hoja y la raíz, cuando son regadas con agua con sales, pero la hoja sobresale ya que aquí se obtuvieron valores más altos que en la raíz. Esto puede explicarse ya que cuando el sodio entra a la planta, dependiendo del tipo de especie vegetal, este se puede concentrar en la parte aérea, mientras que otras especies pueden retenerlo en la raíz. En esta condición cuando el Na^+ se retiene en la raíz, se ha observado que los canales catiónicos no selectivos (NCCS), son activados por ERO como HO^\cdot y el H_2O_2 y por canales independientes de voltaje (VIC) (demidchik *et al.*, 2003) este último permite la entrada de Na^+ y Ca^+ y la salida masiva de K^+ . Los canales NCCS activados por HO^\cdot , son encontrados en mayor medida en la zona de elongación de la raíz y se activa solo a potenciales hiperpolarizantes, este canal permite la entrada de Na^+ y Ca^+ pero no la salida de K^+ (Foreman, 2003). Por otro parte, los canales NCCS activados por H_2O_2 , se localizan mayormente en la zona madura de la raíz, estos canales no son canales de K^+ , en realidad solo permiten la entrada de Ca^+ (White, 2000)

Asi mismo observamos que las concentraciones de K^+ , en la planta OMG en los tres casos (hoja, tallo y raíz) se presentan en mayor nivel cuando son regadas con agua + NaCl y agua dulce, con respecto a las plantas WT. El K^+ es uno de los principales iones que emplan las células para la osmorregulación, es decir para

equilibrar la concentración de iones al interior de la célula con respecto al exterior (Chaves, 2006; Singh y Kanemasu, 1983), ya que el K^+ no es tóxico para las funciones celulares, por esta razón, para determinar tolerancia a la salinidad se mide la relación K^+/Na^+ y se determina si el valor entero de la relación es adecuado, ello permite llevar a cabo funciones fisiológicas y bioquímicas que perturban el exceso de Na^+ .

El hecho de que el citoplasma ocupa únicamente de un 5-10% el volumen del protoplasma y el apoplasto alrededor de un 3% del volumen del mesófilo, la vacuola es un organelo muy importante para acumular azúcares, aminoácidos y sales tóxicas como el Na^+ . Además este organelo ayuda a mantener la regulación baja de Na^+ y una alta concentración de K^+ en el citoplasma (Shi y Zhu 2002).

9. Conclusiones

- El estrés por NaCl 100 mM, afecta la morfología en las plantas WT en la elongación del tallo, tamaño y número de hojas.
- Los niveles de ERO son mayores en plantas OMG cuando se encuentra bajo un estrés por NaCl 100 mM, pero el crecimiento de estas no se ve afectado
- Las concentraciones del ión Na⁺ en plantas OMG regadas con NaCl 100 mM, son menores en la raíz en comparación con las concentraciones de las plantas OMG.
- Los niveles del ión K⁺ se almacenan en mayor cantidad en la parte del tallo de las plantas OMG cuando son regadas con agua baja en sales y NaCl 100mM.
- El suelo donde estuvieron sembradas las plantas OMG con riego de NaCl 100 mM, presento mayor concentración de Na⁺, esto indica que la planta absorbe menos sodio del suelo. Por el contrario, el suelo donde fueron sembradas plantas WT regado con agua baja en sales presentó la mayor concentración de K⁺, esto implica que las plantas WT absorben menos potasio, lo que podría ser un factor crucial para disminuir sus procesos de osmoregulación y la reducción del crecimiento observado.
- La relación de clorofilas a/b y totales, no son significativas en las plantas OMG ni WT.
- La planta OMG durante su crecimiento en ambos tratamientos no mostró alguna enfermedad en las hojas como clorosis o necrosis.

Referencias

- Amirsadeghi, S., Robson, C. y G Vanlerberghe. 2007. The role in mitochondrion in plant responses to biotic stress. *Physiol Plantarum*, 129: 253-266.
- Amudha, J. y Balasubramani, G. 2011. Recent molecular advances to combat abiotic stress tolerance in crop plants. *Biotechnology and Molecular Biology Review*. 6 (2): 31-58.
- Appels, A.; Lagudah, H.E. 1990. Manipulation of chromosomal segments from wild wheat for the improvement of bread wheat. *Austral. J. Plant Physiol.* 17:253-266
- Asada, K. 2006. Production and scavenging of ROS in chloroplasts and their functions. *Plant physiol.* 141: 391-396.
- Ashraf MY, Bhatti AS 2000. Effect of salinity on growth and chlorophyll content in rice. *Pak. J. Ind. Res.* 43: 130-131.
- Akça, Y.; Samsunlu, E. 2012. The effect of salt stress on growth, chlorophyll content, proline and nutrient accumulation, and K/Na ratio in walnut. *Pak. J. Bot.* 44: 1513-1520.
- Barkla, B.J., Zingarelli, L., Blumwald, E., Smith J.A.C. 1995. Tonoplast Na⁺/H⁺ Antiport Activity and Its Energization by the Vacuolar H⁺-ATPase in the Halophytic Plant *Mesembryanthemum crystallinum* L. *Plant Physiol.* 109: 549-556.
- Bedard, K. y Krause, K. 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 87: 245-313.
- Bohnert, H.S., Gang, Q., Li, P., Ma, S., Indu Ruppasara, S. 2005. Salinity stress adaptation competence in the extremophile *Thellungiella halophila* in comparison with its relative *Arabidopsis thaliana*. *The plant journal.* 44: 826-839.
- Bronwy, J.B., Vera, E.R., Balderas, E., Pantoja, O. 2007. Mecanismos de tolerancia a la salinidad en plantas. *Biología.* 14: 263-272.
- Campo, S., Baldrich, P. Messeguer, J., Lalanne, E., Coca, M., San Segundo, B. 2014. Overexpression of a calcium-dependent protein kinase confers salt and drought

tolerance in rice by preventing membrane lipid peroxidation. *Plant Physiology*. 165: 688-704.

Calderón-Torres M, Castro D, Montero P y Peña A. 2011. *DhARO4*, induction and tyrosine nitration in response to reactive radicals generated by salt stress in *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 10:733-46.

Chaves, M. M. 2006 Effects of water deficits on carbon assimilation. *J. Exp. Bot.*, 42: 1-16.

Chinnusamy, V. y Zhu, J. K. 2004. *Plant salt tolerance*. Published by Springer 41: 241-251.

Conaza. 1994. Plan de acción para combatir la desertificación en México, Sedesol-FAO, primera edición: 110.

Cramer, G.R., E. Epstein y A. Läuchli. 1990. Effects of sodium, potassium, and calcium on salt-stressed barley. I. Growth analysis. *Physiol. Plant*. 80: 83-88.

Cristo, E.; González, M. C.; Cárdenas, R. M. y Pérez, N. Evaluación de la tolerancia a la salinidad en el estado juvenil de tres nuevas líneas de arroz (*Oryza sativa* L.) utilizando marcadores morfoagronómicos. *Cultivos Tropicales*, 2001. 22 (2). 43-45.

De Herralde, F.; Biel, C. y Save, R. 2003. Leaf photosynthesis of eight almond tree cultivars. *Biol. Plantarum*, 46 (4): 557-561.

Del Amor, F.M., M. Carvajal, V. Martínez y A. Cerdá. 1998. Response of muskmelon plants (*Cucumis melo* L.) to irrigation with saline water. *Acta Hort*. 456: 263-268.

Del Amor F. M., Martínez V., Cerdá A. 2001. Salt Tolerance of Tomato Plants as Affected by Stage of Plant Development. *Hortscience* 36 (7): 1260–1263.

Demidchik, V., Shabala, S., Coutts, K., Tester, M. y Davies J. 2003. Free oxygen radicals regulate plasma membrane Ca⁺ and K⁺ permeable channels in plant root cells. *Journal of cell science*, 116: 81-88.

Dodd, K., Guppy, c., Lockwood, P., Rochester I. 2010. The effect of sodicity on cotton: plant response to solutions containing high sodium concentrations. *Plant Soil*. 330: 239-249.

- Eyidogan, F. y Oz, M. T. 2007. Effect of salinity on antioxidant responses of chickpea seedlings. *Acta Physiol. Plant.* 29: 485-493.
- Florescano E. 2004. El patrimonio nacional de México. Primera reimpresión. FCE CONACULTA. D.F., México
- Foolad, M. R. 2007. Genome Mapping and Molecular Breeding of Tomato. *International Journal of Plant Genomics.* 64: 56
- Foreman, J., Demidchik, V., Bothwell, J. H., Mylona P., Miedema, H., Torres M. A., Linstead, P., Costa, S. Brownlee, C., Jones J. D. G., Davies, J. M. y Dolan, M. 2003. ROS produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature.* 422: 442-446.
- Garg N. y Manchanda G. 2010. ROS generation in plants: Bone or bane? *Plant biosystems.* 143: 81-96.
- Garcia, M. y Jáuregui, D. 2008. Efecto de la salinización con NaCl o Na₂SO₄ sobre la anatomía foliar sobre dos tipos de caña de azúcar (*Saccharum spp.*) con tolerancia salina diferencial. *ERNSTIA.* 18(1): 89-105.
- Gonzales F. 2003. Las comunidades vegetales de México. INE-SEMARNAT. D.F., México.
- González Hernandez J.C., Cardenas Monroy C. A., Pena A. 2004. Sodium and potassium transport in the halophilic yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* 21: 403-412.
- González, L. M. y Ramírez, R. 1999. La absorción en agua por las semillas de arroz a altas concentraciones salinas, como posible indicador de la tolerancia varietal. *Cultivos Tropicales.* 20 (1): 31-34.
- Hasegawa, P.M., Bresson, R.A., Zhu, J.K., Bohnert, H.J. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual review of plant physiology and plant molecular biology.* 51: 463-499.
- Hu, Y., Schimdhalter, U. 2005. Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *J. Plant Nutr. Soil. Sci* 168: 541-549.
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). 2015. Estadísticas del pronóstico del día mundial del suelo. Consultado en: <http://www.inegi.org.mx>

Intergovernmental Panel on Climate Change IPCC. 2007. Cuarto informe de evaluación del grupo intergubernamental de expertos sobre el cambio climático. Consultado en: <https://www.ipcc.ch>

Joseph, B. y Jini, D. 2011. Development of salt stress- tolerant plants by gene manipulation of antioxidant enzymes. *Asian Journal of Agricultural Reseach*. 5 (1): 17-27.

Karimi, S.; Rahemi, M.; Maftoun, M. E. y Tavallali, V. 2009. Effects of Long-term Salinity on Growth and Performance of Two Pistachio (*Pistacia L.*) Rootstocks. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 3 (3): 1630-1639.

Kaye, Y., Golani, Y., Leshem, Y., Cohen, G., Ercetin, M., Gillaspay, G., Levine, A. 2011. Inostol polyphosphate 5-phosphatase 7 regulates the production of ROS and salt tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 157 (1):

Kleine T, Leister D2016. Retrograde signaling: organelles go networking. *Biochim Biophys Acta* 1857: 1313–1325

Kumar, S. Titov, S. Islam, M. M. Ayesha, S.; Sultana, S. y Haque, Md. S. 2009. Phenotypic and genotypic screening of rice genotypes at seedling stage for salt tolerance. *Global Journal of Biotechnology & Biochemistry*. 2: 126-131.

Kwak, J.M., Mori, I.C., Pie, Z.M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Danyl, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D., Schraeder, J.L. 2003. NADPH oxidase *AtrbohD* and *AtrbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *The embo journal*. 22: 2623-2633.

Madueño, A. M., García, P. D., Martínez H. J., Rubio, T. C. 2006. Germinación y desarrollo de plántulas de frijolillo *Rhynchosia minima* (L) DC en condiciones de salinidad. *Idem* 24: 47-54.

Mahajan, S. y N. Tuteja. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch Biochem Biophys.*, 444: 139-158.

Marschener., H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Segunda edición. London Academic Press.

Maathuis, F. 2014. Sodium in plants: perception, signalling and regulation of sodium fluxes. *Journal of experimental botany*. 65: 849-858.

- Maathuis, F., Amtmann, A. 1999. K⁺ nutrition on Na⁺ toxicity: The basis of celular K⁺/Na⁺ Ratios. *Annals of botany* 84: 123-133.
- Meloni, D. A., Ayrault, G., David, R. N., Abdala, G. 2008. Tolerancia a la salinidad en dos portainjertos de citrus: crecimiento, composición mineral y ajuste osmótico. *Revista FCA UNcuyo* 40: 97-104.
- Miller, G.; Suzuki, N.; Ciftci-Yilmaz, S. y Mittler, R. 2009. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ.* 33 (4): 453-67
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V. and Breusegem, F.V. (2011) ROS signaling: the new wave *Trends Plant Sci.* 16: 300–309.
- Munns, R. Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist*, 2005. 165: 645-663.
- Niu, X., Bressan, R., Hasegawa, P. y Pardo J. 1995. Ion homeostasis in NaCl in salt stress environments. *Plant physiol.* 109: 735-742.
- Nobel P., Loik M. 1999. Form and function of cacti. In. Robichaux RH (ed.). *Ecology of Sonoran desert plants and plant communities*. The University of Arizona Press Tucson.
- Nuñez, M., Mazorra., L. M., Martínez, L., González, M.C., y Robaina, C. 2007. Análogos de brasionesteroides revierten pacialmente el impacto del estrés salino en el crecimiento inicial de las plántulas de dos genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.) *Cultivos tropicales*. 28 (2): 95-99.
- Leung, J. y Giraudat, J. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Anual review of plant physiology and plant molecular biology*. 49: 199-222.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación FAO. 2008. El estado mundial de la agricultura y la alimentación. Consultado en <http://www.fao.org>

- Pandey, S. K.; Nookarajua, A.; Upadhyaya, Ch. P.; Gururani, M. A.; Venkatesh, J.; Kim, D. H. y Park, S. W. 2011. An Update on Biotechnological Approaches for Improving Abiotic Stress Tolerance in Tomato. *Crop Sci.*, 51: 2303-2324.
- Pastore, D., Stoppelli, M., Di Fonzo, N., Passarella S. 1999. The existence of th K⁺ channel in plant mitochondria. *Journal Biol.Chem.* 274: 26683- 26690.
- Partida, R. L., Velázquez, A. T. J., Acosta, V. B., Angulo, G. C. E. 2006. Extractos vegetales y su efecto en la conductividad eléctrica de los suelos salinos y de soluciones Idem. 24: 83-89.
- Pérez Alfocea F; Balibrea ME; Santa Cruz A; Estan MT. 1996. Agronomical and physiological characterization of salinity tolerance in a commercial tomato hybrid. *Plant-and-Soil.* 180 (2): 251-257.
- Pirasteh, H.; Emam, A. Y.; Ashraf, M. y Foolad, M. R. 2012. Exogenous Aplication of Salicylic Acid and Chlormequat Chloride Alleviates Negative Effects of Drought Stress in Wheat. *Advanced Studies in Biology.* 4 (11): 501-520.
- Popova, M. P., Bankova, V. S., Bogdanov, S., Tsvetkova, I., Naydenski, C., Marcazzan, G. L., & Sabatini, A. G. (2006). Chemical characteristics of poplar type propolis of different geographic origin. *Apidologie*, 38: 306-311.
- Prista, C., Almagaro, A., Loureiro-Dias, M.C., Ramos, S. 1997. Physiological basis of the high salt tolerance of *Debaryomyces hansenii*. *Appl. Environ microbol* 63 (10): 40005-4009.
- Quiroz Chavez J. García. P. LM., Quiroz F. 2012. Mejoramiento vegetal usando genes con funciones conocidas.
- Ramirez, S. R., Larrinaga, M. J. A., Murillo, A. B., Hernandez, S. N. Y., Fujiyama, H. 2008. Respuesta antioxidante enzimática de los frutos de chile ancho (*Capsicum annuum L.*), bajo condiciones de estrés salino. *Tecnociencia* 33: 377. 388.
- Reumann, S., Weber, A. 2006. Plant peroxisomes respire in the light: some gaps of photorespiratory C (2) cycle have become filled others remain. *Bichim. Biophys. Acta.* 1763: 1496-1510.

- Rivera F, Sotelo Z. G., Díaz de León F. 2004. Lipoperoxidation and antioxidant enzymes of refrigerated persian limes (*Citrus latifolia* Tanaka) as influenced by prestorage hot treatment. *Journal of Food Biochemistry*.28: 305-317.
- SAGARPA., INEGI., 2014. Encuesta nacional agropecuaria (ENA). Boletín de prensa Num. 328/15.
- SEMARNAT. 2003. Compendio de estadísticas ambientales en el 2002. D.F., México.
- Singh, P. y Kanemasu, E. 1983. Leaf and canopy temperatures of Pearl Millet genotypes under irrigated conditions. *Agronomy Journal*. 75: 497-501.
- Singh, K. N.; Chatrath, R. 2001. Breeding for adaptation to environmental factors. chapter 8. salinity tolerance. 170 p.
- Shalata, A.; Mittova, V.; Volokita, M.; Guy, M. y Tal, M. 2001. Response of the cultivated tomato and its wild salt-tolerant relative *Lycopersicon pennellii* to salt- dependent oxidative stress: *Physiol. Plant*,. 112: 487-494.
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.*. 158: 221-227.
- Shi, H. y Zhu, J. 2002. Regulation of expression of the vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter gene *AtNHX1* by salt stress in abscisic acid. *Plant. Mol. Biol.* 50: 543-550.
- Sickler, C. M.; Edwards, G. E.; Kiirats, A.; Zhifang, G. y Loescher, W. H. 2007. Response of mannitol-producing *Arabidopsis thaliana* to abiotic stress. *Funct. Plant. Biol.* 34: 382-391.
- Strogonov B. P., Kabanov V. V., Shevjakova N. I., Lapina L. P., Komizerko E. I., Popov B. A., Dastanova R. K., Prykhod'ko L. S. 1970. Structure and function of plant cell under salinity. Moscow, Nauka, Russia.
- Sudhir, P., Murthy, S. 2004. Effects of salt on basic process of photosynthesis. *Photosynthetica*. Vol. 42 p. 481-486.
- Taffouo, V.D.; Nouck, A.H.; Dibong, S.D.; Amougou, A. 2010. Effects of salinity stress on seedlings growth, mineral nutrients and total chlorophyll of some tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) cultivars. *African Journal of Biotechnology*. 9 (33): 5366 - 5372.

- Van Breusegem, F y Dat. J. 2006. Reactive oxygen species in plant cell death. *Plant Physiol.*, 141: 384-390.
- Valderrama, R., Corpas, F., Carreras, A., Fernández-Ocaña, A., Chaki, M., Luque, F., Gómez-Rodríguez, M., Colmenero-Varea, P., del Río, L. and Barroso, J. (2007) Nitrosative stress in plants. *FEBS Lett* .581: 453–461.
- Villa Castorena M., Catalan Valencia E. A., Inzunza Ibarra M. A., Ulery A. L., (2006). Absorción, translocación de sodio y cloro en plantas de chile fertilizadas con nitrógeno y crecidas con estrés salino. *Fitotecnia Mexicana*. 29 (1): 79-88.
- Walker, D. J., Leigh, R.A. y Miller, A. J. 1996. Potassium homeostasis in vacuolate plant cells. *Proceeding of the National Academic of Sciences USA*. 93: 10510-10514.
- White, P. 2000. Calcium channels in higher plants. *Biochim. Biophys Acta*, 1465: 171-189.
- White, P. J. y Broadley, M. R. 2003. Calcium in plants. *Annals of botany*. 92: 487-511.
- Yuen, G.; Luo, Y.; Sun, X. y Tang, D. 2004. Evaluation of a crop water stress index for detecting water stress in water wheat in the North China Plain. *Agricultural Water Management*, 64 (1): 29-40.
- Zhang, L. A., Outlow, W. H. 2001. Abscisic acid introduced into the transpiration stream accumulates into the guard cell apoplast an causes stomatal closure. *Plant cell environ.* 24: 1045-1054.
- Zhu, J. K. 2003. Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current opinión in plant biology*. 6: 441-445.
- Zushi, K. y Matsuzoe, N. 2009. Seasonal and cultivar differences in salt-induced changes in antioxidant system in tomato. *Sci. Hort.* 120: 181-187.

Anexos

Anexo 1

Para obtener la cantidad total de los iones Na^+ y K^+ de la tierra donde se germinarían y crecerían las plantas de tabaco, se llevó a cabo un análisis completo de suelo, dicho análisis se muestra a continuación.

Análisis de suelo

Muestra Denominación	Color en seco	Color en humedo	Arena %	Limo %	Arcilla %	Textura
	7.5YR 4/2Pardo	7.5YR 2.5/2 Pardo muy oscuro	68	23	9	Franco arenosa

Densidad aparente kg/m^3	Densidad real kg/m^3	Porosidad %	pH	Mat orgánica %	Capacidad de intercambio cationico
0.55	1.61	50.65	7.45	18.98	43.97

El número que se muestra en la tabla, es el porcentaje de Na^+ y K^+ disponible en la tierra, se puede saber si este número es bajo, medio o alto comparándolo con las tablas de criterio de valoración con respecto al ión.

Tablas de criterios de valoración de Na^+ y K^+ interciables

Criterio	Potasio intercambiable (%)
Bajo	<2
Medio	3-4
Alto	>8

Categoría	Porcentaje de Na+ intercambiable
Suelo sódico	>15
Suelo no sódico	<15

Determinación de proteínas por método de UV y curva estándar de suero de albumina (BSA)

En la siguiente tabla se indican las concentraciones empleadas para hacer la curva estándar de BSA y tomar las lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 280 nm, para graficar la curva estándar.

Tabla I de la concentración de albumina de suero bovino

<i>Tubo</i>	<i>BSA</i>	<i>H2O</i>
1	25 µl	975 µl
2	50 µl	950 µl
3	125 µl	875 µl
4	250 µl	750 µl
5	375 µl	625 µl
6	500 µl	500 µl

Con las lecturas obtenidas en la medición de proteínas, se realizó una regresión lineal obteniendo la ecuación de la recta con la siguiente fórmula:

$$Y = b + mx$$

Para la obtención de proteínas totales de las muestras de hoja, tallo y raíz en tratamiento y control, su lectura se realizó con un factor de disolución de 990 µl de agua destilada con 10 µl de muestra.

Los resultados totales de las muestras, fueron sustituidas en la ecuación de la recta obtenida y multiplicados por el factor de disolución, posteriormente con el resultado de las lecturas de EROs

Anexo 2

ANOVA Especies Reactivas de Oxígeno (Hoja)

Tabla ANOVA	SS	df	MS		
Tratamientos (entre columnas)	120000	3	39000		
Residuo (dentro columnas)	67000	16	4200		
Total	180000	19			
Prueba de Tukey	Diferencia de medias	q	¿Significativo? P < 0.05?	Suma	95% CI of diff
WT H2O vs OMG H2O	-10	0.35	No	ns	-130 to 110
WT H2O vs WT NaCl	-86	3	No	ns	-200 to 32
WT H2O vs OMG NaCl	-190	6.6	Yes	**	-310 to -75
OMG H2O vs WT NaCl	-75	2.6	No	ns	-190 to 42
OMG H2O vs OMG NaCl	-180	6.3	Yes	**	-300 to -65
WT NaCl vs OMG NaCl	-110	3.7	No	ns	-220 to 11

ANOVA ERO (Tallo)

ANOVA Table	SS	df	MS		
Treatment (between columns)	140000	3	46000		
Residual (within columns)	150000	16	9400		
Total	290000	19			
Prueba de Tukey	Diferencia de medias	q	¿Significativo? P < 0.05	Suma	
WT H2O vs OMG H2O	-87	2	No	ns	-260 to 89
WT H2O vs WT NaCl	-170	4	No	ns	-350 to 3.4
WT H2O vs OMG NaCl	-220	5	Yes	*	-390 to -41
OMG H2O vs WT NaCl	-85	2	No	ns	-260 to 91
OMG H2O vs OMG NaCl	-130	3	No	ns	-310 to 46
WT NaCl vs OMG NaCl	-45	1	No	ns	-220 to 130

ANOVA ERO Raíz

Tabla ANOVA	SS	df	MS		
Tratamiento (entre columnas)	730000	3	240000		
Residuo (dentro columnas)	410000	16	26000		
Total	1100000	19			

Prueba de Tukey	Diferencia de medias	q	¿Significativo? P < 0.05?	Suma	95% CI of diff
WT H2O vs OMG H2O	-18	0.25	No	ns	-310 to 270
WT H2O vs WT NaCl	-420	5.8	Yes	**	-710 to -130
WT H2O vs OMG NaCl	-360	5.1	Yes	*	-650 to -73
OMG H2O vs WT NaCl	-400	5.6	Yes	**	-690 to -110
OMG H2O vs OMG NaCl	-340	4.8	Yes	*	-640 to -55
WT NaCl vs OMG NaCl	53	0.75	No	ns	-240 to 340

Anexo 3

Tabla ANOVA	SS	df	MS		
Tratamiento (entre columnas)	2448	3	816		
Residuo (dentro columnas)	20400	27	755.6		
Total	22850	30			

Prueba de Tukey	Diferencia de medias	q	¿Significativo? P < 0.05?	Suma	95% CI of diff
WT H2O vs OMG H2O	-4.421	0.468	No	ns	-41.00 to 32.16
WT H2O vs WT NaCl	-13.37	1.497	No	ns	-47.96 to 21.22
WT H2O vs OMG NaCl	14.91	1.277	No	ns	-30.32 to 60.15
OMG H2O vs WT NaCl	-8.951	0.9709	No	ns	-44.66 to 26.76
OMG H2O vs OMG NaCl	19.34	1.624	No	ns	-26.76 to 65.43
WT NaCl vs OMG NaCl	28.29	2.46	No	ns	-16.25 to 72.82

ANOVA Iones solubles (Na+) Hoja

ANOVA Na+ Tallo

Tabla ANOVA	SS	df	MS		
Tratamiento (entre columnas)	2.4	3	0.78		
Residuo (dentro columnas)	4.4	12	0.37		
Total	6.7	15			

Prueba de Tukey	Diferencia de medias	q	¿Significativo? P < 0.05?	Suma	95% CI of diff
WT H2O vs OMG H2O	0.56	1.6	No	ns	-0.91 to 2.0
WT H2O vs WT NaCl	-0.16	0.52	No	ns	-1.5 to 1.1
WT H2O vs OMG NaCl	-0.55	1.8	No	ns	-1.9 to 0.76
OMG H2O vs WT NaCl	-0.72	2.3	No	ns	-2.0 to 0.59
OMG H2O vs OMG NaCl	-1.1	3.5	No	ns	-2.4 to 0.20
WT NaCl vs OMG NaCl	-0.39	1.4	No	ns	-1.5 to 0.75

ANOVA Na+ Raíz

Tabla ANOVA	SS	df	MS		
Tratamiento (entre columnas)	0.038	3	0.013		
Residuo (dentro columnas)	0.48	11	0.044		
Total	0.52	14			

Prueba de Tukey	Diferencia de medias	q	¿Significativo? P < 0.05?	Suma	95% CI of diff
WT H2O vs OMG H2O	0.11	0.88	No	ns	-0.41 to 0.62
WT H2O vs WT	-0.033	0.31	No	ns	-0.49 to 0.43
WT H2O vs OMG	0.032	0.28	No	ns	-0.45 to 0.51
OMG H2O vs WT	-0.14	1.3	No	ns	-0.60 to 0.32
OMG H2O vs OMG	-0.074	0.66	No	ns	-0.55 to 0.41
WT vs OMG	0.065	0.66	No	ns	-0.36 to 0.49

ANOVA Iones solubles K+ Hoja

Tabla ANOVA	SS	df	MS		
Tratamiento (entre columnas)	1.7	3	0.56		
Residuo (dentro columnas)	11	12	0.95		
Total	13	15			

Prueba de Tukey	Diferencia de medias	q	¿Significativo? P < 0.05?	Suma	95% CI of diff
WT H2O vs OMG NaCl	-0.57	1	No	ns	-2.9 to 1.8
WT H2O vs WT H2O	-0.65	1.3	No	ns	-2.8 to 1.5
WT H2O vs OMG NaCl	-0.94	1.9	No	ns	-3.1 to 1.2
OMG NaCl vs WT H2O	-0.078	0.15	No	ns	-2.2 to 2.0
OMG NaCl vs OMG NaCl	-0.37	0.73	No	ns	-2.5 to 1.7
WT H2O vs OMG NaCl	-0.29	0.66	No	ns	-2.1 to 1.5

ANOVA K+ Tallo

Tabla ANOVA	SS	df	MS		
Tratamiento (entre columnas)	3.2	3	1.1		
Residuo (dentro columnas)	21	12	1.8		
Total	24	15			

Prueba de Tukey	Diferencia de medias	q	¿Significativo? P < 0.05?	Suma	95% CI of diff
WT H2O vs OMG H2O	-0.89	1.2	No	ns	-4.1 to 2.3
WT H2O vs WT NaCl	0.3	0.43	No	ns	-2.6 to 3.2
WT H2O vs OMG NaCl	-0.48	0.7	No	ns	-3.4 to 2.4
OMG H2O vs WT NaCl	1.2	1.7	No	ns	-1.7 to 4.1
OMG H2O vs OMG NaCl	0.41	0.6	No	ns	-2.5 to 3.3
WT NaCl vs OMG NaCl	-0.77	1.3	No	ns	-3.3 to 1.7

ANOVA K+ Raíz

Tabla ANOVA	SS	df	MS		
Tratamiento (entre columnas)	0.48	3	0.16		
Residuo (dentro columnas)	1.3	12	0.11		
Total	1.8	15			

Prueba de tukey	Diferencia de medias	q	¿Significativo? P < 0.05?	Suma	95% CI of diff
WT H2O vs OMG H2O	-0.45	2.4	No	ns	-1.2 to 0.34
WT H2O vs WT NaCl	0.014	0.083	No	ns	-0.69 to 0.72
WT H2O vs OMG NaCl	-0.055	0.33	No	ns	-0.76 to 0.65
OMG H2O vs WT NaCl	0.47	2.8	No	ns	-0.24 to 1.2
OMG H2O vs OMG NaCl	0.4	2.4	No	ns	-0.31 to 1.1
WT NaCl vs OMG NaCl	-0.069	0.47	No	ns	-0.68 to 0.54

ANOVA Suelo Na+

Tabla ANOVA	SS	df	MS		
Tratamiento (entre columnas)	34	3	11		
Residuo (dentro columnas)	2.6	16	0.16		
Total	37	19			

Prueba de Tukey	Diferencia de medias	q	¿Significativo? P < 0.05?	Suma	95% CI of diff
WT H2O vs OMG H2O	0.42	2.3	No	ns	-0.31 to 1.2
WT H2O vs WT NaCl	-2.1	12	Yes	***	-2.9 to -1.4
WT H2O vs OMG NaCl	-2.6	14	Yes	***	-3.3 to -1.9
OMG H2O vs WT NaCl	-2.6	14	Yes	***	-3.3 to -1.8
OMG H2O vs OMG NaCl	-3	17	Yes	***	-3.7 to -2.3
WT NaCl vs OMG NaCl	-0.44	2.5	No	ns	-1.2 to 0.29

ANOVA Suelo K+

Tabla ANOVA	SS	df	MS		
Tratamiento (entre columnas)	0.36	3	0.12		
Residuo (Dentro columnas)	0.081	16	0.0051		
Total	0.44	19			

Prueba de Tukey	Diferencia de medias	q	¿Significativo? P < 0.05?	Suma	95% CI of diff
WT H2O vs OMG H2O	0.2	6.1	Yes	**	0.067 to 0.32
WT H2O vs WT NaCl	0.29	9.2	Yes	***	0.16 to 0.42
WT H2O vs OMG NaCl	0.35	11	Yes	***	0.22 to 0.48
OMG H2O vs WT NaCl	0.096	3	No	ns	-0.033 to 0.22
OMG H2O vs OMG NaCl	0.16	4.9	Yes	*	0.028 to 0.29
WT NaCl vs OMG NaCl	0.062	1.9	No	ns	-0.067 to 0.19

