



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

“Clonación del gen *DhARO4*, implicado en la respuesta antioxidante de la levadura halotolerante *Debaryomyces hansenii* para su posible uso biotecnológico en el mejoramiento de plantas de cultivo a la salinidad de suelos.”

## T e s i s

Para obtener el título de:

### Bióloga

Presenta:

**Mancilla Galván Victoria Abril**

**Directora de tesis:** Dra. Claudia Marissa Calderón Torres

Revisores:

Dr. Antonio Peña Díaz

Dra. Elvia Lucía Pavón Meza

Dra. Alina Uribe García

Dra. Tania Garrido Garduño



"Por mi raza hablará el espíritu"

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla Edo. de México 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## Agradecimientos:

A la Dra. Calderón, por su forma de transmitir el conocimiento científico, en usted encontré la guía necesaria para la realización de este trabajo y en general de mi vida académica, gracias por traerme hasta aquí.

A mi comité revisor por el tiempo prestado en este trabajo y su aporte al mismo.

A todas esas personas que me acompañaron a lo largo de esta etapa académica, escucharon mis desahogos y me dieron consejo, especialmente en este último trámite.

A mi familia, por su apoyo incondicional.

Y sobre todo a UNAM por permitirme el acceso a una educación profesional de calidad.

## Índice

Índice .....	i
Índice de abreviaturas .....	ii
Índice de figuras .....	iii
Índice de tablas .....	iii
Resumen .....	iv
Introducción .....	1
Salinidad de los suelos .....	1
Modificación genética .....	3
Antioxidantes como respuesta al estrés salino .....	5
Gen <i>DhARO4</i> .....	7
Antecedentes .....	8
Hipótesis .....	9
Justificación .....	9
Objetivos .....	10
General .....	10
Particulares .....	10
Materiales y Métodos .....	11
Extracción de ADN de <i>D. hansenii</i> .....	11
Reacción en cadena de Polimerasas PCR para gen <i>DhARO4</i> .....	11
Inserción del gen <i>DhARO4</i> al vector TOPO-XL-2 .....	12
Purificación de ADN plasmídico mediante columna de gel de sílice .....	13
Verificación de la presencia del gen <i>DhARO4</i> en el plásmido .....	14
Resultados .....	15
Extracción de ADN de <i>D. hansenii</i> .....	15
Reacción en cadena de Polimerasas PCR para gen <i>DhARO4</i> .....	15
Inserción del gen <i>DhARO4</i> al vector TOPO-XL-2 .....	18

Purificación de ADN plasmídico mediante columna de gel de sílice --	19
Verificación de la presencia del gen <i>DhARO4</i> en el plásmido -----	19
Discusión -----	23
Conclusión -----	26
Perspectivas -----	27
Referencias -----	30

## Índice de abreviaturas

Abreviaturas de las construcciones de ADN recombinante

**Prom:** Secuencia del Promotor y el Gen *DhARO4* (Promotor + Gen *DhARO4*)

**Gen:** Gen *DhARO4*

**Topo-Prom 1:** Sitio de clonación múltiple del vector TOPO-XL-2 con el Promotor+Gen *DhARO4*

**Topo-Prom 2:** Repetición de la construcción TOPO-XL-2+Promotor+Gen *DhARO4*

**Topo-Prom-E:** TOPO-XL-2+Promotor+Gen *DhARO4* en la bacteria *Escherichia coli*

**Topo-Gen 1:** TOPO-XL-2+Gen *DhARO4*

**Topo-Gen 2:** Repetición TOPO-XL-2+Gen *DhARO4*

**Topo-Gen-E:** TOPO-XL-2+Gen *DhARO4* en *E. coli*

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Esquema de un vector de clonación -----	4
<b>Figura 2.</b> Esquema del proceso de estrés.-----	7
<b>Figura 3.</b> Esquema de la selección de bacterias transformadas -----	13
<b>Figura 4.</b> ADN de <i>D. hansenii</i> . -----	15
<b>Figura 5.</b> Secuencia del gen <i>DhARO4</i> con su promotor. -----	16
<b>Figura 6.</b> Productos de la PCR -----	18
<b>Figura 7.</b> Diseño in silico de la construcción del vector	
TOPO-XL2 con la secuencia del promotor y el gen <i>DhARO4</i> . -----	19

<b>Figura 8.</b> Crecimiento de <i>E. coli</i> transformada en placas con medio LB. -----	19
<b>Figura 9.</b> ADN plasmídico y corte con enzimas de restricción -----	20
<b>Figura 10.</b> ADN plasmídico y corte con enzimas de restricción -----	21
<b>Figura 11.</b> Alineamiento de la secuencia original del gen <i>DhARO4</i> -----	22
<b>Figura 12.</b> Alineamiento de la secuencia original del promotor+gen <i>DhARO4</i> -----	22
<b>Figura 13.</b> Esquema del proceso de digestión y ligación. -----	28
<b>Figura 14.</b> Crecimiento de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> transformada en placas con medio LB. -----	28
<b>Figura 15.</b> Producto de aproximadamente 1000 pb correspondiente al gen <i>DhARO4</i> con los oligonucleótidos diseñados -----	29

## Índice de tablas

<b>Tabla 1.</b> Abreviaturas para cepas o plásmidos -----	11
<b>Tabla 2.</b> Especificaciones de cada oligonucleótido empleado -----	17
<b>Tabla 3.</b> Ejemplos de enfermedades generadas por mutaciones puntuales en la naturaleza-----	24

## Resumen

En los últimos años, la salinidad de los suelos ha aumentado, convirtiéndose en uno de los principales retos para la agricultura mundial, pues sus efectos afectan fisiológica y morfológicamente a las plantas y ello se traduce en un decremento en las cosechas. A consecuencia de esto se han buscado nuevas estrategias que permitan mejorar el rendimiento y la estabilidad de los cultivos bajo estrés salino; una de ellas es el uso de biotecnologías como el mejoramiento genético; este último se puede aplicar a los distintos niveles: la exclusión iónica, la tolerancia osmótica y la tolerancia tisular.

Con el fin de mejorar la resistencia a la salinidad de plantas agronómicamente relevantes como el jitomate (*Solanum lycopersicum*), en este trabajo se modificó un plásmido comercial con el gen *DhARO4* de la levadura extremo tolerante al sodio *Debaryomyces hansenii*. Para obtener de forma masiva este gen, se diseñaron oligonucleótidos de anclaje que contenían secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción, y en una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se aisló el gen del resto del ADN genómico de la levadura. El gen se insertó en el vector comercial TOPO-XL-2 óptimo para los productos de PCR de extremos romos, permitiendo una ligación inmediata; posteriormente se transformó a la bacteria *Escherichia coli* con el plásmido TOPO-XL-2-*DhARO4*. Mediante selección por antibiótico se obtuvieron colonias transformadas con el plásmido y el gen de interés. Se verificó la integridad de la secuencia del gen *DhARO4* en el vector TOPO-XL-2 mediante su secuenciación. Logrando clonas exitosas para cada construcción que tienen el cien por ciento de similitud con la secuencia original del gen *DhARO4*.

## Introducción

A lo largo de la historia de la humanidad, uno de los principales problemas a los que se han enfrentado diferentes civilizaciones, ha sido la salinización de los suelos, siendo de especial importancia los suelos de cultivo. Este problema es de tal magnitud que se propuso como la causa del desplome de la civilización mesopotámica (Stavi *et al.*, 2021). En la actualidad, el aumento de las sales en los suelos de cultivo ha ido en aumento y sigue siendo un problema sin una solución definitiva.

## Salinidad de los suelos

La Sociedad de Ciencias del Suelo de América define la salinidad de los suelos como la acumulación de sales solubles en agua que repercuten en el crecimiento de las plantas. Dentro de estas sales se encuentran los iones que requieren las plantas como nutrientes, estos son los iones potasio ( $K^+$ ) y sulfato ( $SO_4^{-2}$ ) y los no esenciales, que son además tóxicos en concentraciones elevadas, como los iones de sodio ( $Na^+$ ) y cloruro ( $Cl^-$ ); por lo mismo, cuando se habla de salinidad de suelos se suele hacer referencia en especial a estos dos iones (Stavi *et al.*, 2021).

La salinidad de los suelos suele darse por procesos naturales que dependen de las condiciones geográficas y topográficas de cada zona, generalmente se asocian a regiones áridas y semiáridas porque no cuentan con un flujo de agua constante, o zonas costeras, ya que se puede tener deposición eólica y pluvial de sales provenientes de la superficie marina. A su vez la salinidad en estas zonas depende de cambios climáticos que influyen en el nivel del mar, un ejemplo histórico es el aumento de zonas de inundación con agua marina en Holanda (Metternicht y Zinck, 2008; Bresler *et al.*, 2012; Ullah *et al.*, 2021). Un ejemplo más reciente del efecto del cambio climático es el aumento del nivel del mar en el país de Bangladesh en donde la extensión de los suelos salinos de las zonas costeras pasó de 800,000 hectáreas en 2001, a 1.2 millones de hectáreas en 2011 (Bimal y Harun, 2017).

Otros procesos que aumentan la salinidad de los suelos, son los que derivan de la actividad humana, por ejemplo la tala acelerada de bosques y selvas así como el consumo desmedido de recursos naturales y el manejo inadecuado de la agricultura ya sea por sistemas de riego deficientes, uso desmedido de los fertilizantes y plaguicidas así como el uso de agua de riego sin un tratamiento apropiado, debido a que suele llevar una concentración alta de sales (Endo *et al.*, 2011; Greene *et al.*, 2016).



Esta problemática no se restringe a un grupo pequeño de países, de acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés) y su sistema de mapeo global de suelos afectados por salinidad (GSASmap por sus siglas en inglés), en 2021 estimaron que más del 6% de los subsuelos y más del 3% de los suelos superficiales presentan problemas de salinidad, más de dos tercios de estos se encuentran en zonas áridas o semiáridas. Estos datos son representativos del panorama general; sin embargo, sólo toman en cuenta los datos proporcionados por 118 países.

En países como México, los suelos salinos afectan al 60% de tierras destinadas a la agricultura. La Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural destaca en su informe del 2021 que la salinidad leve afecta a 2.43 millones de hectáreas del suelo agrícola superficial, mientras que para el subsuelo aumenta a 3.37 millones de hectáreas. Por su parte, la salinidad moderada afecta a 1.27 millones de hectáreas de suelo superficial, mientras que para el subsuelo aumenta a 2.15 millones de hectáreas.

Cabe resaltar que aunque el informe fue emitido en el 2021, los datos recopilados abarcan los años 1999 a 2009 por lo que no se conoce del todo el grado de afectación que se ha acumulado en los últimos años; sin embargo, hay pronósticos a mediano y largo plazo basados en modelos de predicción múltiples que evalúan los aspectos del cambio climático y cómo afectará a países como México que se encuentran rodeados por mar en donde se reitera que los suelos con mayor riesgo de salinidad son los de zonas áridas por ejemplo, los estados de Baja California, Baja California Sur y Sonora. Peor aún con estos criterios ponen a México como el cuarto país que se verá más afectado (Hassani *et al.*, 2021).

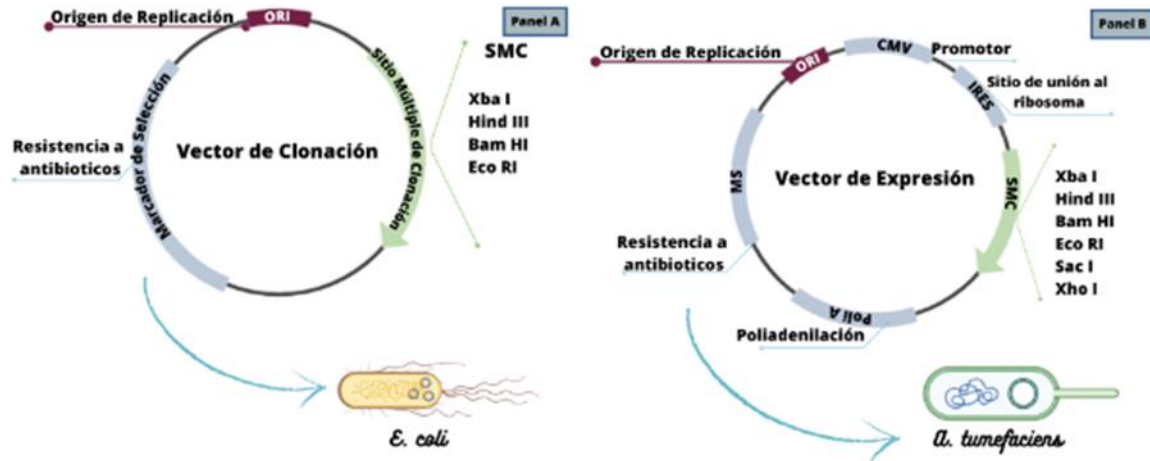
Para enfrentar los problemas de salinización en suelos de cultivo, se han buscado diferentes estrategias, que van desde la prevención del problema, la restauración del suelo o directamente en mejorar el rendimiento y la estabilidad de los cultivos bajo estrés salino, siendo esta última la más redituable. Se puede dar a través de la selección de variedades resistentes al estrés salino, lo que se ve limitado a la variabilidad que se tenga de especies cultivables. Otra alternativa, quizás de las más novedosas es la generación de cultivos resistentes a través de la modificación genética (Saeed *et al.*, 2011).

La modificación genética se puede aplicar a los mecanismos de tolerancia al sodio de las plantas, clasificados en tres distintos niveles: la exclusión iónica empleando genes que permitan la expulsión del sodio, la tolerancia osmótica al usar genes implicados en la síntesis de compuestos orgánicos para disminuir el efecto osmótico de las sales y la tolerancia tisular implementando genes que actúan en respuesta al estrés oxidante generado por salinidad elevada. (Roy *et al.*, 2014).

## **Modificación genética**

El desarrollo de ciencias como la genética y biología molecular ha traído consigo nuevas aplicaciones biotecnológicas. Con el descubrimiento y comprensión de la función y estructura del ADN se han logrado identificar, aislar y clonar genes específicos, con el desarrollo de la ingeniería genética se ha logrado modificar el ADN de un organismo o combinar el de varios lo que se ha denominado tecnología del ADN recombinante. Cada una de estas aplicaciones trata de hacerle frente a diversas problemáticas que aquejan actualmente a la sociedad. Dentro del sector agroalimentario se enfoca en mantener la seguridad alimentaria al satisfacer la demanda cada vez mayor de alimentos sin incrementar la presión sobre los recursos naturales (William *et al.*, 2010; Wilches Flórez, 2010).

La inserción de genes exógenos a las células de la planta se puede dar por distintos métodos, ya sean directos (físicos o químicos) o indirectos, mediante vectores biológicos (Salazar Montes, Sandoval Rodríguez y Armendáriz Borunda, 2013), en ambos métodos se insertan secuencias recombinantes de ADN a una célula; se denominan secuencias recombinantes porque llevan una secuencia que es reconocida por la maquinaria de replicación o transcripción de la célula receptora y la secuencia de un gen de un organismo diferente que es de interés replicar o expresar en la célula receptora. Existen diferentes tipos de vectores, los plásmidos de bacterias, los de virus y los producidos de forma artificial. La mayor diferencia entre los vectores radica en que unos se emplean para obtener múltiples copias del plásmido que contiene el gen de interés; vectores de clonación, mientras que otros pueden emplearse no solo para la replicación u obtención de copias, también para la transcripción de los genes exógenos dentro de las células receptoras de la planta; vectores de expresión debido a que producen ARN mediante la transcripción y la proteína codificante a partir del mismo; a diferencia del primero, este tiene que tener una baja expresión basal, es decir generar pocas copias para que en el momento en el que se inserte en la planta este no interfiera más de lo esperado en el organismo. Sus estructuras constan de:



**Figura 1.** Esquema de un vector de clonación y expresión. Panel A: Vector de clonación. Panel B: Vector de expresión. Modificado de (Salazar Montes, Sandoval Rodríguez y Armendáriz Borunda, 2013).

Vector de Clonación:

- a) Origen de Replicación: Una secuencia de ADN que provee un sitio único de reconocimiento a las proteínas que identifican el sitio de inicio de la replicación ORI de bacterias, para que el plásmido se pueda integrar a bacterias como *Escheria coli* y obtener suficiente cantidad de plásmido.
- b) Marcador de selección: Un gen que confiere resistencia a un antibiótico o que genera un fenotipo distinguible, hay vectores que tienen más de un marcador.
- c) Sitio de clonación múltiple: Un fragmento de ADN que tiene sitios únicos de reconocimiento para enzimas de restricción, son muy cercanos entre sí y es aquí en donde se adhiere el inserto

A parte de las anteriores el vector de expresión cuenta con:

- d) Un promotor fuerte, que es una secuencia que se ubica antes del primer codón (ATG) del gen y por ello se denomina río arriba (“up stream”) con sitios reconocibles para factores de transcripción capaces de regular y dirigir la transcripción del gen adyacente
- e) Un sitio de unión al ribosoma (Internal Ribosome Entry Site IRES): Secuencia Shine-Dalgarno antes del codón de inicio de la traducción. Es la secuencia complementaria al extremo 3’ del ARNr 16S, su hibridación permite el ensamblaje de la maquinaria de inicio de traducción del ARN mensajero.

f) Secuencia de terminación de la transcripción.

g) Inserción de poliadenilación en el extremo 3' para proteger el transcrito de la degradación por nucleasas.

Para la obtención de un organismo o célula transgénicos se requiere de la expresión estable del gen insertado; esto se logra principalmente con las secuencias promotoras empleadas, una de las más comunes en cuanto a plantas se refiere es la del promotor del gen que codifica la subunidad ribosómica 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV35S). Es un promotor constitutivo, lo que significa que es independiente a factores ambientales y estadios de desarrollo lo que asegura niveles constantes de expresión, como su nombre lo dice fue aislado de un patógeno vegetal el cual al infectar a la planta libera su ADN al interior de la célula y ocupa la RNA polimerasa II del huésped para transcribirse. Esta propiedad fue la que determinó su relevancia biotecnológica (De Guglielmo y Fernández, 2016).

La estrategia más empleada para llevar a cabo este proceso es mediante el uso de la bacteria del género *Agrobacterium*. Debido a la facilidad y alto porcentaje de transformación en distintas especies vegetales, esta bacteria sirve como mediador para la introducción de genes de interés en plantas gracias a su proceso de evolución altamente especializado para infectarlas por medio de la transferencia horizontal de genes (Benítez Burraco, 2005; Díaz Granados y Chaparro-Giraldo, 2012).

De esta forma se han implantado características en los cultivos como mayor calidad y valor nutrimental, resistencia a plagas y enfermedades, así como tolerancia a los diversos tipos de estrés presentes en su entorno entre ellos la salinidad (Phillips, 2008).

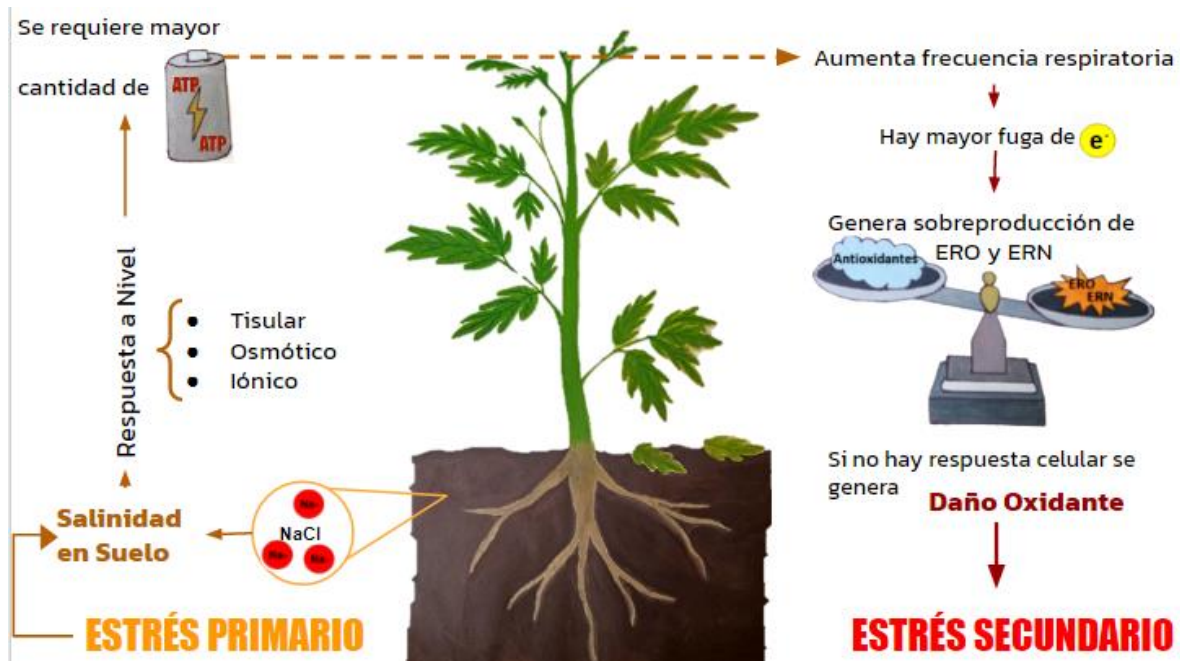
Las estrategias para contrarrestar los efectos asociados al estrés en cada nivel (Iónico, osmótico y tisular) son diversos. Por ejemplo en la respuesta a nivel tisular, una estrategia es el aumento de antioxidantes en la planta para evitar que haya una reducción del crecimiento a consecuencia del estrés oxidante

### **Antioxidantes como respuesta al estrés salino**

Durante el crecimiento en suelos salinos o por riego con agua alta en sales, se producen diferentes problemas celulares, uno de ellos es el estrés oxidante debido al aumento de radicales libres en la mitocondria y cloroplastos. Los radicales libres; son moléculas altamente reactivas por la presencia de un electrón desapareado en su capa de valencia. Los radicales

libres más comunes son las especies reactivas del oxígeno (ERO), estas moléculas se forman por la reducción incompleta o parcial de la molécula de oxígeno, y se dan como resultado de reacciones REDOX presentes en los procesos metabólicos. Se conforman por el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ), en concentraciones bajas tienen efectos benéficos como mensajeros de señalización en los procesos de senescencia, fotorespiración, fotosíntesis, movimiento estomático, etc. (Flieger *et al.*, 2021).

Para mantener la concentración basal de EROs que se producen en los principales organelos, las plantas cuentan con diversos sistemas antioxidantes que pueden actuar previniendo la formación de radicales libres, inactivándolos o interrumpiendo las reacciones de oxidación. Estos sistemas se adaptan a la corta vida media de los radicales libres y generalmente actúan en dos fases; en la primera, los antioxidantes enzimáticos convierten las ERO existentes como el  $O_2^{\bullet-}$  y el  $H_2O_2$  en agua y oxígeno, mientras que en la segunda fase actúan los antioxidantes no enzimáticos, capaces de reaccionar inmediatamente con los radicales que se van generando para evitar que oxiden a las biomoléculas (Avello y Suwalsky, 2006; Kotha *et al.*, 2022). Este balance se ve afectado cuando la planta se encuentra expuesta a algún tipo de estrés, los tipos de estrés que afectan principalmente a las plantas en la actualidad son la sequía y la salinidad de los suelos que usualmente se correlacionan entre sí (Morales *et al.*, 2002). Cuando hay condiciones de estrés por salinidad la planta responde con la activación de sus tres mecanismos de tolerancia al sodio, estos mecanismos son dependientes de ATP; por lo tanto, las cadenas transportadoras de electrones aumentan su productividad y a su vez la concentración de EROs aumenta, si el estrés es continuo, los sistemas antioxidantes se ven rebasados y se rompe el balance entre la acumulación de EROs y estos sistemas, lo que genera un estrés secundario oxidante, y si no hay una respuesta celular, el estrés oxidante pasa a ser crónico, convirtiéndose en una condición oxidante que afecta la estructura y función de las biomoléculas (Das y Roychoudhury, 2014). Como se observa en la figura (2).



**Figura 2.** Esquema del proceso de cómo un estrés primario (salinidad) conduce a un estrés secundario (daño oxidante) dentro de las plantas.

Sin embargo, existen plantas más resistentes que otras al estrés salino, lo que a su vez evita llegar al estrés oxidante. Dentro de las mismas especies hay variedades que tienen el umbral de tolerancia al estrés salino más alto, esto se debe a que usan diferentes aminoácidos como compuestos orgánicos compatibles o antioxidantes que al ser compatibles no interfieren con el metabolismo normal de las células y se pueden acumular a nivel de citosol y organelos (Roy *et al.*, 2014).

### Gen *DhARO4*

*Debaryomyces hansenii* es una levadura marina de la clase hemiascomycetes, se le denomina una levadura no convencional ya que no pertenece al género *Saccharomyces*. Presenta halotolerancia elevada es decir que, se adapta a medios con altas concentraciones de NaCl llegando a soportar hasta 4M, esta condición se debe a una serie de respuestas al estrés salino como la osmoregulación, que incluye la síntesis de compuestos orgánicos compatibles, la expulsión o almacenamiento del sodio intracelular en la vacuola o fuera de la célula, todos estos procesos coordinados a nivel genético. Por todo esto se considera un organismo de relevancia biotecnológica con múltiples aplicaciones en la industria, salud y en el ambiente (Sacerdot *at al.*, 2008; González-Hernández y Flores-Herrejón, 2022).

Con la secuenciación de su genoma se han podido conocer los genes que forman parte de estas respuestas, uno de ellos es el gen *DhARO4* que codifica para la 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato-7-fosfato sintasa (DAHP sintasa), esta es la primera enzima que actúa en la ruta del ácido shikímico, que es la ruta encargada de la síntesis de aminoácidos aromáticos, específicamente tirosina, éste forma parte del conjunto de los aminoácidos aromáticos que componen a las proteínas y en *D. hansenii* este gen se expresa cuando se encuentra bajo estrés salino y lo utiliza para generar tirosina y usarla como antioxidante para neutralizar ERO y evitar la oxidación de biomoléculas (Calderon Torres *et al.*, 2006; Calderon Torres *et al.*, 2011).

En las plantas, la tirosina es importante para la síntesis de diversos metabolitos secundarios, específicamente es precursora de alcaloides isoquinolínicos, pigmentos betaláinicos y quinonas como plastoquinonas y tocoferoles. Los microorganismos y las plantas también pueden sintetizar aminoácidos aromáticos a través de la misma ruta, por lo tanto también cuentan con la enzima DAHP sintasa, aunque es distinta a la de levaduras y microorganismos, presentan la misma función; condensar fosfoenolpiruvato y D-eritrosa4-fosfato (Maeda y Dudareva, 2012; Parthasarathy Anutthaman *et al.*, 2018).

Se ha reportado que la tirosina puede tener un efecto antioxidante a través de los metabolitos secundarios de los que es precursor y de forma directa cuando se aplica de forma extracelular a plantas que estén bajo algún tipo de estrés, mientras que en otros organismos si se ha reportado que bajo diversos tipos de estrés actúa como antioxidante de forma directa (Al-Mohammad y Al-Taey, 2019; Neyra *et al.*, 2021). Por ello, se ha propuesto que la introducción del gen *DhARO4* en las planta podría mejorar su resistencia a la salinidad.

## **Antecedentes**

En el trabajo de Calderón Torres *et al.*, (2019) se incorporó el primer gen de la vía de síntesis de aminoácidos aromáticos *DhARO4*, que codifica para la enzima sintasa de 3-desoxi-D-arabinoheptulosonato 7-fosfato (sintasa DAHP) denominada ARO4p, presente en la levadura halotolerante *Debaryomyces hansenii* (Zopf, 1889) a la planta *Nicotiana tabacum* L., debido a que previamente Calderón Torres *et al.*, (2011) demostraron que a partir de la expresión de este gen se da la síntesis de tirosina que actúa como antioxidante en respuesta al estrés salino. Los resultados fueron favorables, ya que las plantas genéticamente modificadas tuvieron un mayor crecimiento en comparación con las plantas silvestres con y sin riego de agua salina NaCl 100 mM.

Por otro lado, De la Torre (2020) estudió los efectos que tiene el estrés salino sobre la planta de jitomate comercial *Solanum lycopersicum* L. (1794) y comprobó que se genera un daño oxidante que afecta a rutas y procesos metabólicos lo que se tradujo a un déficit de crecimiento y cosecha.

Mientras que Suárez, Calderón y Iturriaga en (2009) clonaron de forma independiente y en conjunto los genes TPS1 y TPS2 que codifican para la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa que es un metabolito secundario presente en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y lo insertaron en Alfalfa (*Medicago sativa* L.). Las plantas que tenían la construcción de ambas copias de los genes tuvieron un incremento de tamaño, biomasa y nivel de follaje cuando se encontraban bajo algún tipo de estrés abiótico: sequía, salinidad y temperaturas extremas, tanto bajas, como altas fueron las mismas que contenían mayor cantidad de trehalosa almacenada. De esta forma se comprueba que incrementando la síntesis de trehalosa, un metabolito secundario, con genes exógenos, de levadura, la planta es capaz de hacerle frente a diferentes tipos de estrés. Por lo que se sustenta el uso de genes exógenos en el mejoramiento de las plantas a la salinidad.

## **Hipótesis**

Considerando el interés para la producción de plantas transgénicas resistentes a salinidad elevada en el presente trabajo, se propone la construcción de un vector de clonación que contenga el gen *DhARO4* y su verificación. Para ello, se diseñarán y construirá un vector recombinante, bajo la premisa general de que un plásmido recombinante, se logra a partir del corte con enzimas de restricción que cortan las mismas secuencias del gen *DhARO4* y del sitio de múltiple restricción del plásmido comercial TOPO-XL-2, que se unirá por complementariedad de bases, entonces se podrá verificar la construcción del plásmido recombinante mediante su secuenciación, si estas son correctas se podrán expresar en vector que infectará a la planta modelo.

## **Justificación**

Considerando que la salinidad de suelos es un problema mundial, se requieren estrategias novedosas y al alcance de todos que le permitan a los distintos cultivos hacerle frente. Otra situación muy importante es el uso de semillas modificadas, si tomamos como ejemplo uno de los cultivos más relevantes para el país como lo es el de jitomate, de acuerdo con datos



de la CEDRSSA, de los 50.596 millones de hectáreas que se ocuparon en 2016 con cultivo de jitomate, 49.559 millones de hectáreas son de cultivos con semillas modificadas, aunque esta organización no especifica si fueron modificadas por hibridación o genéticamente, sí declaran que la mayor parte de estas semillas se obtienen de empresas particulares, muchas de ellas transnacionales. En el caso específico de las semillas de chile y jitomate, algunas empresas transnacionales las producen en México y las envían a EEUU o Europa a empacarse para volverse a importar como semilla y por lo tanto se incrementan los costos de producción y bajan las ganancias generadas con la comercialización del producto.

Por todo esto se plantea promover investigaciones nacionales enfocadas en el mejoramiento genético de cultivos, en este caso al proveer a la plantas de cultivo resistencia al estrés salino mediante el aumento de la tirosina como antioxidante, que de ser posible llegar a una fase de experimentación en campo, permitiría por un lado tener tecnología propia y por otro las semillas estarán al nivel de las generadas por las empresas particulares y a largo plazo se evitará que los agricultores tengan gastos extras por el sobreprecio de las semillas que se comercializan.

## **Objetivo General**

Clonación del gen *DhARO4* de la levadura halotolerante *Debaryomyces hansenii* para su posterior uso biotecnológico en el mejoramiento del crecimiento de plantas de cultivo en suelos con salinidad elevada.

## **Objetivos Particulares**

A partir del ADN genómico de la levadura extremo tolerante al sodio *Debaromyces hansenii*, aislar el gen *DhARO4* mediante una amplificación de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con oligonucleótidos específicos.

Obtener de forma masiva copias del gen *DhARO4*, mediante su inserción al vector comercial TOPO-XL-2 y la transformación de la bacteria *Escherichia coli*.

Verificar la integridad de la secuencia del gen *DhARO4* en el vector TOPO-XL-2 mediante su secuenciación.

## Materiales y Métodos

Para llevar a cabo este trabajo se usaron las cepas descritas en la tabla 1. La levadura halotolerante *D. hansenii* se mantuvo y creció en cajas Petri con extracto de levadura 1%, peptona 1% y dextrosa 2% (YPD por sus siglas en inglés) y agar 1.5%.

**Tabla 1.** Abreviaturas para cepas o plásmidos

Cepas/Plásmidos	Genotipo	Procedencia	Abreviatura
CBS767	<i>Debaryomyces hansenii</i>	American Type Culture Collection ATCC	<i>D. hansenii</i>
Dh5 $\alpha$ -T1	<i>Escherichia coli</i>	Invitrogen	<i>E. coli</i>
TOPO-XL-2	Topoisomerasa 1	Invitrogen	TOPO

### Extracción de ADN de *D. hansenii*

En un tubo Eppendorf se colocó un paquete celular de la levadura, tomándolo directamente de una caja de Petri con medio YPD-agar, y se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua estéril; se añadió buffer de lisis: fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 respectivamente y 3 g de perlas de vidrio con un tamaño de 0.45 mm; se agitó en un vórtex para romper la pared celular de la siguiente forma: 30 s en vórtex y 1 min en hielo (repetiendo cuatro veces). Posteriormente se añadió buffer TE y se sometió a centrifugación durante 5 min a 12000 rpm, se transfirió la capa acuosa a un tubo Eppendorf nuevo y para lavar el ADN se le agregó 1 ml de etanol al 100% y se agitó por inversión. Se sometió a centrifugación durante 10 minutos a 12000 rpm, se desechó el sobrenadante, se añadió solución TE y 3  $\mu$ l de la enzima ARNasa para quitar remanentes de ARN, y se incubó durante 30 min a 37°C. Posteriormente y para precipitar el ADN, se le añadieron 10  $\mu$ l de acetato de amonio y 1ml de etanol 100% y se incubó a -20° C por 20 min; una vez transcurrido el tiempo, el tubo se centrifugó a 12000 rpm 10 min; se descartó el sobrenadante y se dejó evaporar el etanol aproximadamente 5 min. Finalmente el ADN se suspendió en 50  $\mu$ l de agua estéril y se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

### Reacción en cadena de la Polimerasa del ADN para la amplificación del gen *DhARO4*

Se diseñaron los oligonucleótidos *forward*, el cual reconoce la secuencia que va en dirección 5' a 3' y da origen a la misma y *reverse*; el cual reconoce a la secuencia complementaria que

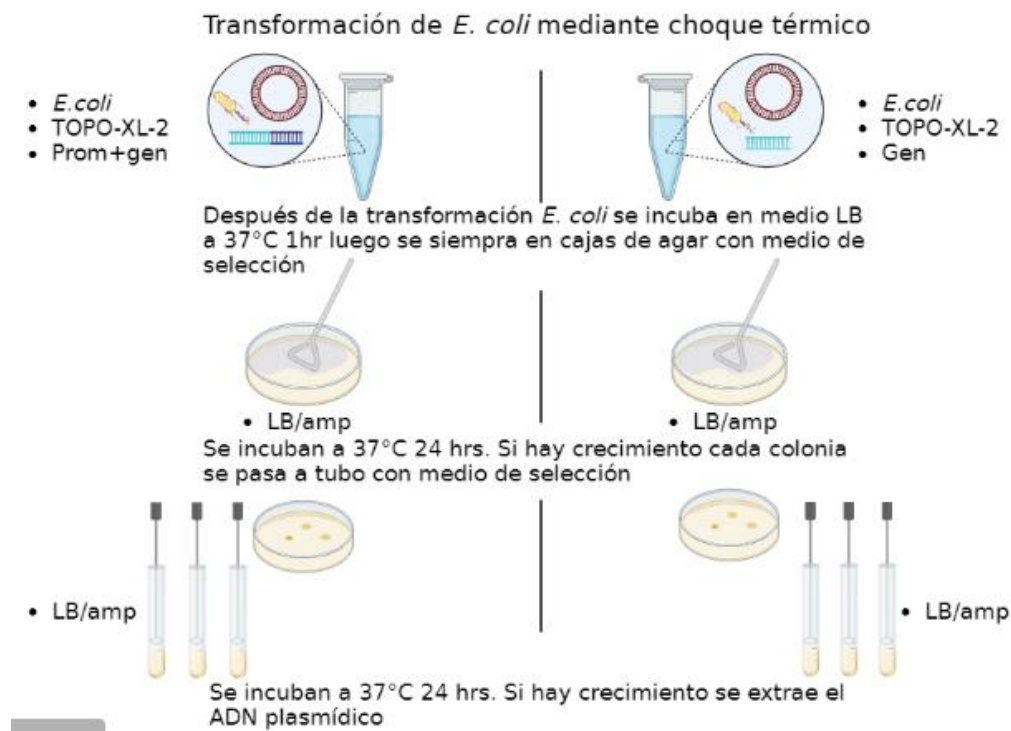
va en dirección 3' a 5' para la amplificación del gen *DhARO4*, a cada secuencia del oligonucleótido se les añadió una secuencia de reconocimiento de una de las enzimas de restricción del vector pRI 101-AN y se enviaron a sintetizar al laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M. Posteriormente se realizó la cuantificación de ADN para saber con cuánto ADN realizar la reacción de PCR. Esta reacción se preparó en un micro tubo de 200  $\mu$ l con buffer de reacción 10x,  $MgCl_2$ , nucleótidos comerciales (2 mM) y la enzima Taq polimerasa de ADN: Platinum *SuperFi* Green de la marca Invitrogen. El termociclador se programó para 30 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C, 56°C para el alineamiento de oligonucleótidos y 72°C para la extensión. La integridad y tamaño del producto de amplificación se verificó mediante una electroforesis con un gel de agarosa al 1% y buffer TBE 0.5 X, al gel se le agrego 0.3  $\mu$ l de bromuro de etidio para poder visualizar los productos.

### **Inserción del gen *DhARO4* al vector TOPO-XL-2**

Una vez confirmada la amplificación del gen se insertó en el vector TOPO. Este vector cuenta con la Topoisomerasa I activada, lo que le permite romper una de las hebras del ADN y unir el producto de PCR de extremos romos. La función de esta enzima no requiere de aporte de ATP para restablecer el enlace fosfodiéster permitiendo una ligación inmediata. Por lo que se siguieron los pasos específicos de protocolo comercial; es decir: Se tomó 1  $\mu$ l del producto de PCR y se añadió 1  $\mu$ l de solución salina, 1  $\mu$ l del vector TOPO y se ajustó con agua estéril para tener una reacción final de 6  $\mu$ l, se mezcló suavemente y se incubó por aproximadamente 5 min en hielo. Posteriormente se tomó una de las alícuotas de la bacteria *Escherichia coli* químicamente competentes y se agregaron 2  $\mu$ l de la solución de clonación TOPO previamente preparada con el gen de interés. Se dejó incubando en hielo 30 min. Posteriormente se realizó un choque térmico al colocarlo a 42 °C por 30 seg, e inmediatamente después se incubó en hielo por 1 min. Se agregaron 250  $\mu$ L de medio SOC (Super Optimal Broth with Catabolite Repression) a temperatura ambiente y se incubó una hora a 37 °C en agitación constante a 280 rpm. Finalmente, para comprobar si la inserción del plásmido en la bacteria ocurrió, se esparcieron 50  $\mu$ l de la solución en placas con medio LB y ampicilina, y se dejaron incubando toda la noche a 37 °C. Esperando que si la transformación fue óptima crecieran colonias de la bacteria transformada.

Se siguieron los pasos anteriores hasta obtener colonias de bacterias transformadas y se tomó una de estas para inocularla en 5 ml de medio LB adicionado con ampicilina en una

concentración de 50 µg/mL, se dejó en incubación toda la noche a 37°C y agitación a 200 rpm como se esquematiza en la figura (3).



**Figura 3.** Esquema de la selección de bacterias transformadas en cajas Petri con medio LB y en medio líquido LB.

Este proceso se repitió hasta la obtención de colonias con las construcciones independientes para Gen y para Prom.

### **Purificación de ADN plasmídico mediante columna de gel de sílice**

Después del crecimiento de las bacterias transformadas con el gen *DhARO4*, el ADN plasmídico se purificó con un sistema comercial de la marca AXYGEN que emplea columnas de gel de sílice, tomando 3 ml del cultivo de *E. coli* con el plásmido y centrifugándolo a 12000 g por 1 min, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 250 µl de buffer S1 (solución amortiguadora que contiene ARNasa para degradar ARN). Esta mezcla se pasó a un tubo Eppendorf y se le añadieron 250 µl de buffer S2 (solución salina con detergentes para solubilizar la membrana plasmática). Para permitir la lisis celular se mezcló por inversión de 4 a 6 veces y se incubó por 5 min. en hielo. Una vez pasado ese tiempo se agregaron 350 µl de buffer S3 (solución con una base fuerte para precipitar todo el debris celular que resulta de la lisis celular) y se agitó por inversión de 6 a 8 veces, se centrifugó durante 10 min bajo

las condiciones previas. El sobrenadante se transfirió a la columna de gel de sílice, se centrifugó 1 min. y se desechó el remanente, e inmediatamente se añadieron 500 µl de buffer W1 (solución que contiene sales que inhiben ADNasas que pueden degradar el ADN); para lavar la columna, se centrifugó y desechó el remanente como el paso anterior. Se le dió otro lavado al añadir 750 µl de buffer W2 (solución compuesta principalmente de etanol), se centrifugó y desechó el remanente como en los pasos anteriores. Se volvió a centrifugar por 1 min para desechar en su totalidad la solución de lavado y evitar rastros de etanol. Finalmente la columna se transfirió a un tubo Eppendorf estéril y se agregaron 65 µl de agua estéril, previamente calentada a 42 °C, directo al centro de la columna y se dejó incubando por un minuto, luego se centrifugó por un minuto, el ADN en solución quedó en el tubo Eppendorf debidamente etiquetado.

### **Verificación de la presencia del gen *DhARO4* en el plásmido**

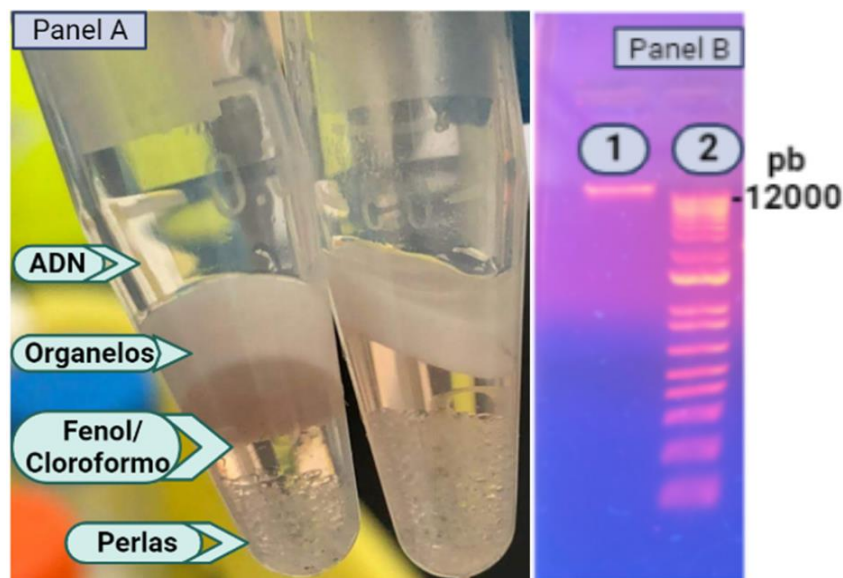
Para confirmar la presencia del gen *DhARO4* en el plásmido se realizó un corte del fragmento con la enzima de restricción *Eco* RI (G\_AATTC) que flanquea la región en donde se integra el gen de interés. Aunado a lo anterior para verificar la integridad de la secuencia del gen *DhARO4*, el plásmido TOPO-*DhARO4* se verificó por la técnica de secuenciación del ADN en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, U.N.A.M. La verificación es importante, ya que un error en la secuencia puede ocasionar que la expresión final del gen en la planta produzca otra enzima y no la requerida.

## Resultados

### Extracción de ADN de *D. hansenii*

Debido a que la levadura *D. hansenii* cuenta con una gruesa pared celular, es necesario un método mecánico para su rompimiento y la extracción efectiva del material genético, de ahí que en el protocolo de extracción se agreguen perlas de vidrio (0.45 mm) lo que permite la lisis de la pared celular y la separación de los distintos componentes celulares, en la figura 8 se observa el uso de las perlas en la extracción de ADN de *D. hansenii*.

Una vez que se obtuvo el ADN genómico, se purificó y se verificó su integridad mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 1%. El ADN genómico es íntegro cuando se observa una banda gruesa con alto peso molecular, como se observa en la figura (4) panel B.



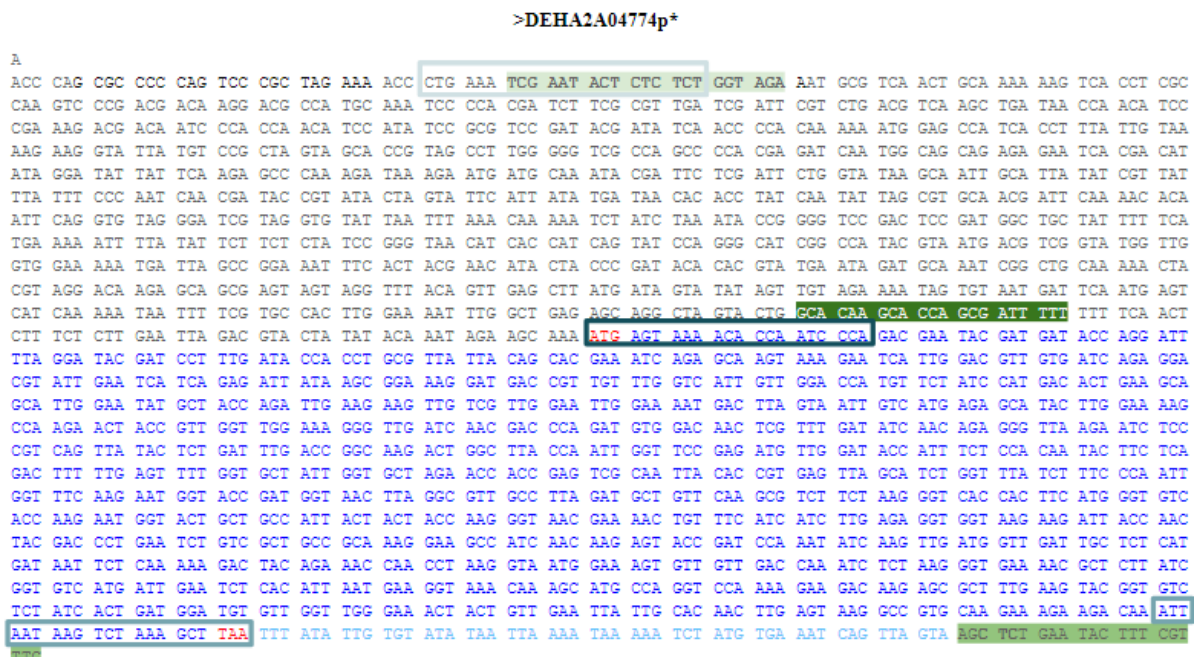
**Figura 4. ADN de *D. hansenii*.** Panel A: fases después de emplear el método mecánico (perlas de vidrio) para romper la pared celular. Panel B: electroforesis en gel de agarosa (1%), en el carril 1, se indica con una flecha la banda de ADN genómico; en el carril 2 se presenta el marcador de tamaño de fragmentos de ADN en kilo pares de bases.

### Reacción en cadena de Polimerasas PCR para gen *DhARO4*

Para amplificar el gen *DhARO4*, se diseñaron dos pares de oligonucleótidos. El primer par amplifica el gen *DhARO4* con su promotor en un único producto de 2142 nucleótidos. El oligonucleótido “forward” reconoce el extremo 5’ de la secuencia del promotor, el oligonucleótido “reverse” reconoce el extremo 3’ de la secuencia del gen; mientras que el segundo par amplifica el gen *DhARO4* en un único producto de 1251. El oligonucleótido “forward” reconoce el extremo 5’ de la secuencia del gen. Cabe señalar que para ambos pares de oligonucleótidos se utiliza la misma secuencia del oligonucleótido “reverse” es decir del

oligonucleótido que reconoce la secuencia del extremo 3' del gen, ya que el resto del segmento que puede usarse para generar otro oligonucleótido tiene un alto contenido de las bases nitrogenadas Timina y Adenina (T-A), que favorece una menor temperatura de desnaturalización a la que se pueden unir sin especificidad los oligonucleótidos de anclaje (esto ocurre porque solo tiene dos puentes de hidrógeno que reducen la temperatura de desnaturalización), por tanto no es óptimo para generar oligonucleótidos adecuados. Aunado a lo anterior y para verificar que los oligonucleótidos diseñados no generaran estructuras secundarias como horquillas o autodimerización se revisaron con el programa OligoCalc (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) y se comprobó que eran específicos, mediante el programa Primer-blast del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Como se mencionó antes, se les agregaron las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción: *Xba* I (T\_CTAGA), *Bam* HI (G\_GATCC) y *Sac* I (GAGCT\_C) que permitirán el corte que produce extremos cohesivos y facilitan el reconocimiento de bases complementarias entre la secuencia del gen y el plásmido de expresión que se usará en trabajos posteriores.

A su vez se utilizaron los oligonucleótidos diseñados por Calderón Torres *et al.*, 2019 a los que se les agregaron las enzimas de restricción *Bam* HI (G\_GATCC) y *Sac* I (GAGCT\_C), como control y para comparar los productos obtenidos. Las especificaciones de cada oligonucleótido empleado se detallan en la tabla 2 y señalizados dentro de la secuencia de *D. hansenii* en la figura (5).



**Figura 5.** Secuencia del gen *DhARO4* con su promotor y las regiones en los que se diseñaron los oligonucleótidos de anclaje. Se observan los oligonucleótidos diseñados encerrados en recuadros, mientras que los oligonucleótidos control se observan subrayados.

**Tabla 2.** Especificaciones de cada oligonucleótido empleado

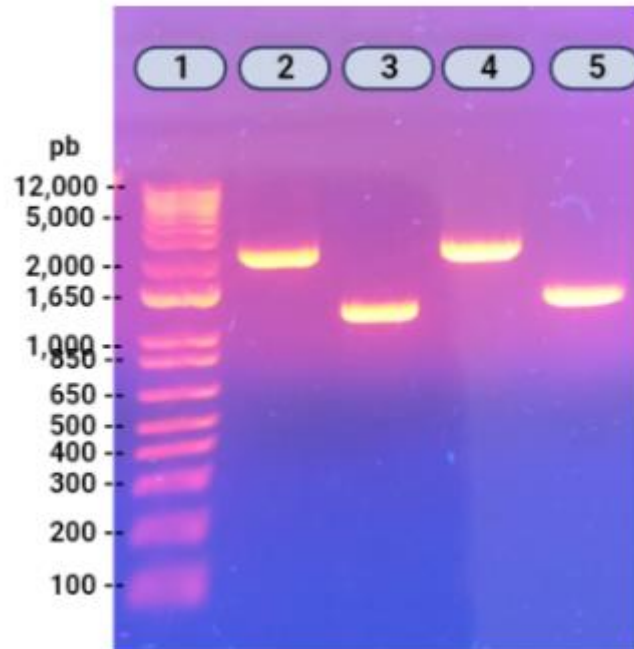
Oligonucleótidos Diseñados						
	Enzima	Oligonucleótidos dirección 5'-3'	en pb	tm °C	Contenido de GC (%)	Producto (pb)
Forward-Prom	<i>Xba</i> I (TCT AGA)	AAG CTG TCT AGA TCG AAT ACT CTC TCT GGT AGA	33	61.9	42	2142
Forward-Gen	<i>Bam</i> HI (GGA TCC)	ATA TAA GGA TCC GCA CAA GCA CCA GCG ATT TTT	33	61.9	42	1251
Reverse	<i>Sac</i> I (GAG CTC)	AAA GAG GAG CTC CAA ACG AAA GTA TTC AGA GCT	33	61.9	42	
Oligonucleótidos Diseñados por Calderón Torres <i>et al</i> 2019						
	Enzima	Oligonucleótidos dirección 5'-3'	en pb	tm °C	Contenido de GC (%)	Producto (pb)
Left-Prom	<i>Bam</i> HI (GGA TCC)	TAC CAT GGA TCC CTG AAA TCG AAT ACT CTC TCT	33	61.9	42	2107
Left-Gen	<i>Bam</i> HI (GGA TCC)	CAT AGA GGA TCC ATG AGT AAA ACA CCA ATC CCA	33	61.9	42	1107
Right	<i>Sac</i> I (GAG CTC)	CGC CGC GAG CTC TTA AGC TTT AGA CTT ATT AAT	33	61.9	42	

Tamaño en pares de bases (pb)

tm, temperatura más probable para la unión de los oligonucleótidos durante una reacción de PCR.

Los productos de amplificación por PCR con los oligonucleótidos de anclaje de la tabla 1, se comprobaron con una electroforesis en un gel de agarosa al 1% y como se observa en la figura (6), con los oligonucleótidos que se diseñaron para obtener la región del promotor y del gen *DhARO4* respectivamente, se obtuvieron los productos de amplificación esperados.

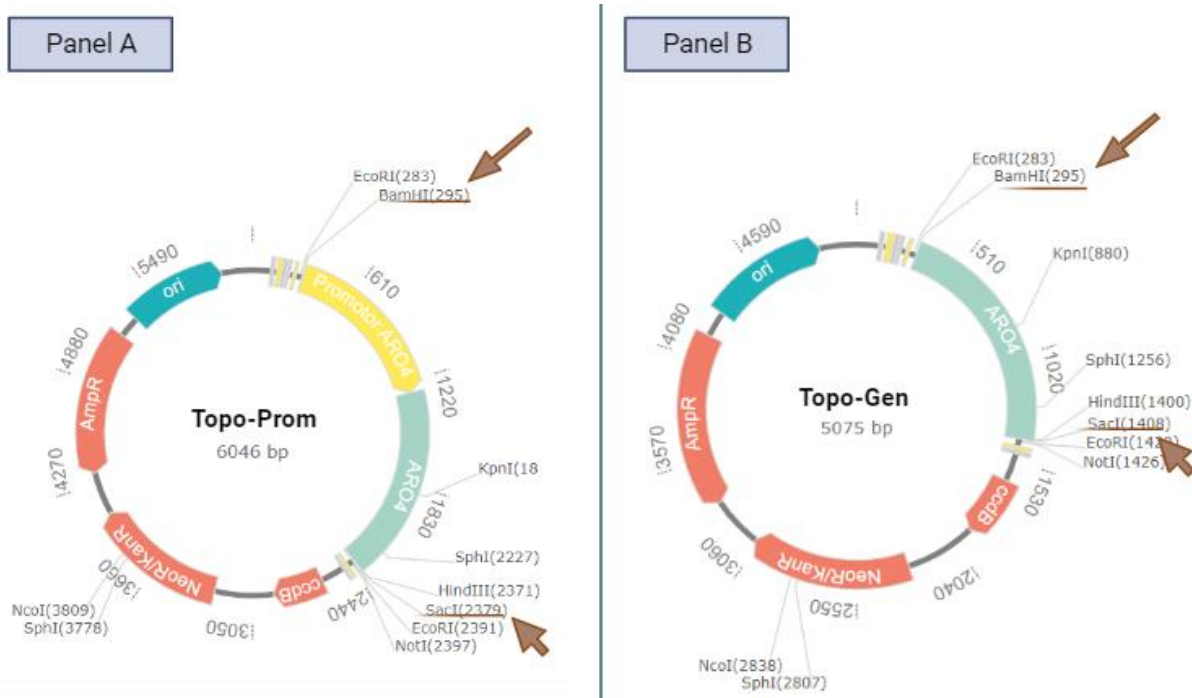




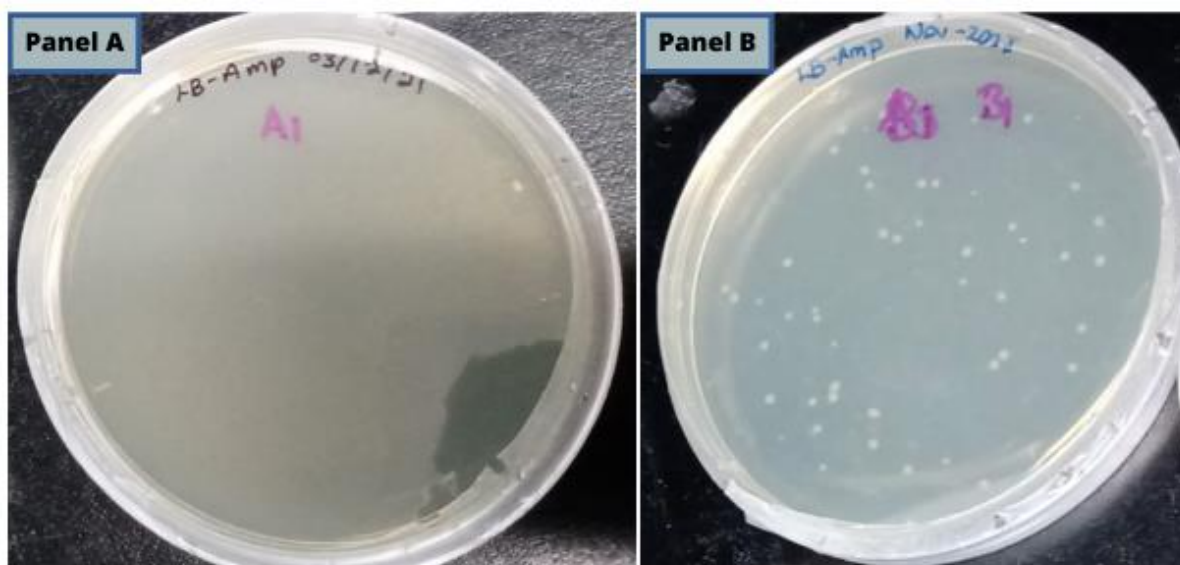
**Figura 6. Productos de la PCR, visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa 1%, carriles:** 1) Estándar del tamaño del ADN en kilopares de bases (1 kb). 2) Producto de 2107 pb correspondientes a Prom amplificado con los oligos control. 3) Producto de 1107 pb correspondientes a Gen amplificado con los oligos control. 4) Producto de 2142 pb correspondientes a Prom amplificado con los oligos diseñados. 5) Producto de 1251 pb correspondientes a Gen amplificado con los oligos diseñados.

### **Inserción del gen *DhARO4* al vector TOPO**

Los productos de amplificación se unieron con el vector de clonación TOPO por acción de la enzima Topoisomerasa I y se obtuvo el vector transformado como se esquematiza en la figura (7), en el panel A) Topo-Prom y panel B) Topo-Gen. Los resultados positivos de la transformación bacteriana con el vector Prom/Gen se comprobaron por el crecimiento de *E. coli* en presencia del antibiótico ampicilina, ya que solo las bacterias que llevaban el vector fueron capaces de crecer en cajas de medio de cultivo LB y antibiótico gracias al gen de resistencia con el que cuenta el vector, como se observa en la figura (8). Cada caja Petri presentaba numerosas colonias, sin embargo; solo se seleccionaban 5 colonias de cada caja para resembrar en medio LB líquido con ampicilina como antibiótico de selección, en cada una de las repeticiones se descartaron las que ya no presentaban crecimiento en el medio líquido denominándolas falsos positivos.



**Figura 7. Diseño *in silico* de la construcción del vector TOPO-XL2 con la secuencia del promotor y el gen *DhARO4*.** Panel A: Vector con la inserción de la región promotora y el gen *DhARO4*. Con flechas en color café se resaltan las enzimas que se añadieron a los oligos. Panel B: Vector con la inserción del gen *DhARO4*. En color café se resaltan las enzimas añadidas a los oligos. El esquema se diseñó con el programa Gen Smart Design (<https://www.genscript.com/gensmart-design/#>).

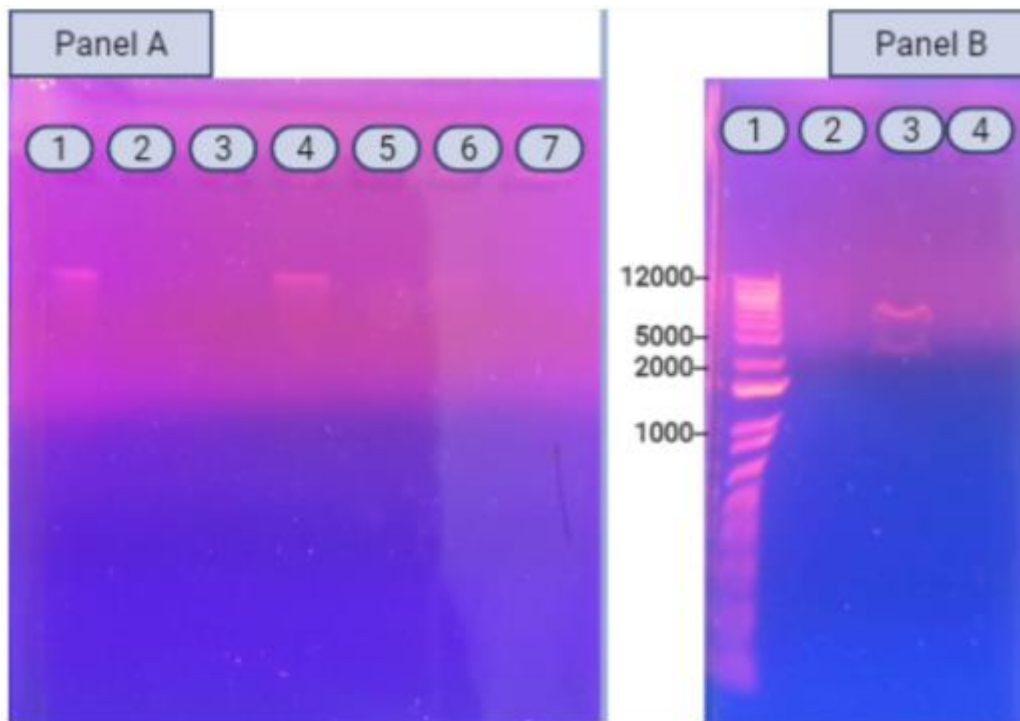


**Figura 8. Crecimiento de *E. coli* transformada en placas con medio LB.** Panel A: Una colonia de *E. coli* transformada Topo-Prom-E. Panel B: Varias colonias de *E. coli* transformada Topo-Gen-E

### Purificación de ADN plasmídico mediante columna de sílice y verificación de la presencia del gen *DhARO4* en el plásmido

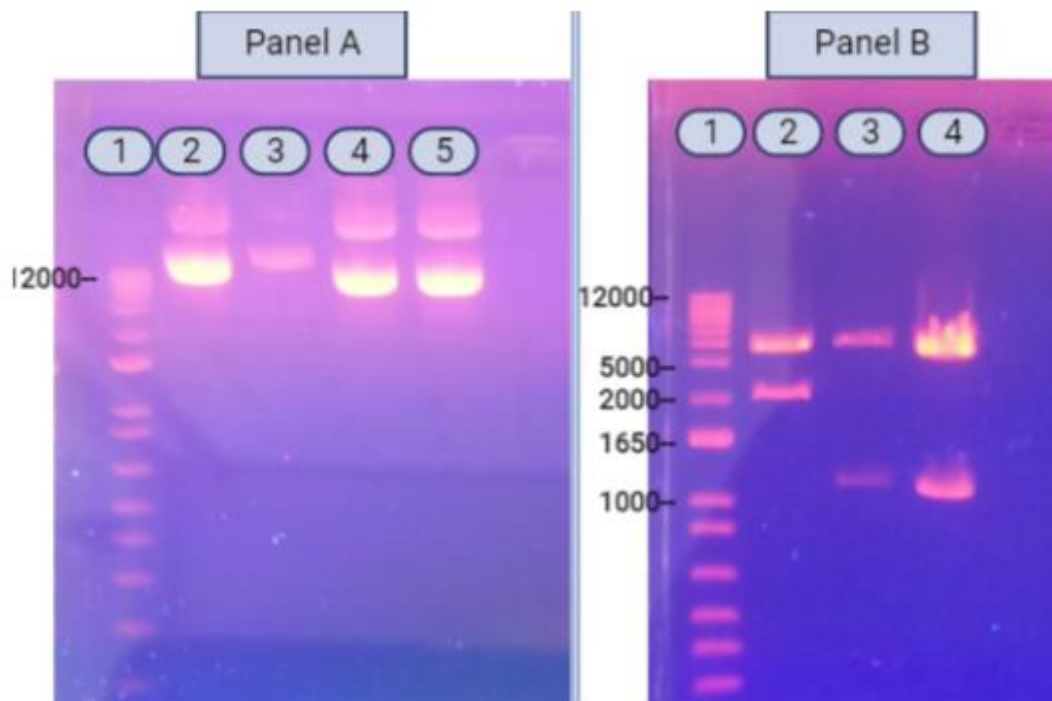
Una vez confirmada la presencia del plásmido en la bacteria se procedió a purificar el ADN

plasmídico. Para verificar una correcta purificación se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% que se observa en la figura (9). El panel A muestra que se obtuvo producto de Topo-Prom con los oligos control, así como de Topo-Prom y de Topo-Gen con los oligos diseñados; sin embargo, se obtuvieron en muy baja concentración, y cuando se realizó la digestión enzimática con la enzima de restricción *Eco* RI, el único que mostró producto fue la muestra de Topo-Prom con los oligos control como se observa en el panel B.



**Figura 9. ADN plasmídico y corte con enzimas de restricción.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% Panel A: ADN plasmídico en los carriles 1(Topo-Prom oligos control) 4 (Topo-Prom oligos diseñados) y ligeramente en el carril 6 (Topo-Gen oligos diseñados). Panel B: Digestión enzimática con *Eco* RI de los 3 ADN plasmídicos del panel A, en el único que se observa corte carril 3 es la muestra Topo-Prom oligos control.

Este paso se repitió y la constante fue que sólo con los oligonucleótidos control se obtuvo una concentración adecuada de vector, en comparación con la baja concentración de cada vector con los oligonucleótidos diseñados descritos en la tabla 3. Por ello se decidió seguir con los oligonucleótidos control, como se observa en la figura (10) panel A) ADN plasmídico obtenido con oligonucleótidos control y panel B) corte con la enzima *Eco* RI en donde se observa el producto de Topo-Prom en el carril 2 y de Topo-Gen en en el carril 3 con la repetición de este en el carril 4.



**Figura 10. ADN plasmídico y corte con enzimas de restricción** Panel A: ADN plasmídico de las muestras Topo-Prom y su repetición con oligos control, carril 2 y 3 respectivamente y Topo-Gen con su repetición con oligos control, carril 4 y 5 respectivamente. Panel B: Digestión enzimática con *Eco*RI de los ADN plasmídicos del panel A, en el que se observan los cortes esperados en el carril 2, 3 y 4.

Con la digestión enzimática se corroboró la presencia del Prom y del Gen, ya que ambas bandas corresponden al tamaño en pb según el estándar de ADN.

Finalmente para verificar que la secuencia estuviera íntegra, es decir, que no hubiese cambios de las bases nitrogenadas, se envió a su análisis de secuenciación de ADN. Con la secuencia de ADN, se realizó un análisis de comparación entre la secuencia publicada bajo el nombre de DEHA2A04774g en la base de datos del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI por sus siglas en inglés) y la secuencia que se obtuvo mediante su secuenciación. En la comparación se empleó el programa Mega X (disponible en internet), que hace una alineación de la secuencia de referencia de la base de datos y las de interés; Topo-Prom 1, Topo-Prom 2, Topo-Gen 1 y Topo-Gen 2.

En la figura (11) se observa el alineamiento entre la secuencia original del gen y las muestras por duplicado, para la muestra Topo-Gen 1 hubo un alineamiento del 100%; sin embargo, como se puede notar en el panel A, hay una transversión en la secuencia de la muestra Topo-Gen 2, renglón 3, y cuando se hace la traducción de la secuencia a los aminoácidos codificantes panel B se observa que este cambio sí afecta el aminoácido codificante de tirosina (Y) a asparagina (N), lo que podría modificar la síntesis de la proteína. Para verificar este cambio en la secuencia del ADN por segunda ocasión se envió a secuenciar cada

segmento del promotor y el gen con oligonucleótidos que sólo reconocen secuencias del vector adyacentes al sitio en el que se integran el ADN foráneo. En la segunda secuenciación se obtuvo un alineamiento del 100% con la secuencia del promotor y del gen, reportado en el banco de datos NCBI.

Para las muestras de Topo-Prom se obtuvo un alineamiento del 96% debido a que les hacen falta bases al gen, como se observa en la figura (12); sin embargo, esto no es problema de cambios en la secuencia amplificada por PCR, si no de la técnica de secuenciación, ya que solo es eficaz para la secuenciación de 1000 pares de bases, segmentos mayores presentan errores en la identificación de bases.



**Figura 11. Alineación de las secuencias del gen insertado en el plásmido TOPO y la secuencia original del gen *DhARO4*.** En panel A) se observa el resultado de la alineación base por base entre la secuencia de la construcción Topo-Gen1 es idéntica a la secuencia original del gene *DhARO4* (100% de igualdad), mientras que la secuencia de la construcción Topo-Gen 2 (renglón 3) tiene 99% de identidad. Panel B: se observa la transversión de bases como el cambio de un aminoácido, de tirosina a asparagina. La alineación se obtuvo con el programa Mega X disponible en internet <https://www.megasoftware.net/>



**Figura 12. Alineamiento de la secuencia original del promotor+gen *DhARO4* (renglón 1) y las que se mandaron a secuenciar Topo-Prom 1 (renglón 2) y Topo-Prom 2 (renglón 3).** Ambas tienen un alineamiento del 96% debido a que hacen falta 51 y 38 bases del gen respectivamente, asociadas al tipo de secuenciación. La alineación se obtuvo con el programa Mega X.

## Discusión

A partir de la mitad de la década de los noventa se optó por el uso de organismos transgénicos con el fin de reducir los problemas que aquejan al sector agroalimentario. Aunque en la actualidad hay diferentes formas de generar un organismo transgénico, en este trabajo se siguió la metodología de ingeniería genética clásica, debido a que los protocolos establecidos son de fácil manejo en el laboratorio así como la disponibilidad de trabajos científicos y productos comerciales que hay para llevarla a cabo. A pesar de no ser una metodología compleja, sí tiene particularidades que pueden modificar el resultado. Una de estas es el diseño de los oligonucleótidos de anclaje que se unirán a la secuencia del gen para su replicación *in vitro*, de tal manera que se produzcan copias exactas y en suficiente cantidad; por lo que si el diseño no es el óptimo se pueden generar copias de otros genes, es decir que son oligonucleótidos de baja especificidad o se puede obtener un número menor de copias del gen esperado; en este trabajo con el diseño de dos pares de oligonucleótidos se encontró que solo un par de oligonucleótidos fue eficiente para obtener un número elevado de copias. Por lo que se descartó este par de oligonucleótidos (tabla 1), ya que si se utilizaban se podría inferir que la hipótesis es errónea sin considerar que solo es un problema en el diseño de los mismos que no se contempló.

Otra particularidad a considerar y probablemente una de las más importantes es que una vez obtenido el vector de clonación con el gen de interés y observar colonias de *E. coli* que crecen en un medio enriquecido y un antibiótico se tiene que comprobar por diferentes metodologías que la secuencia es idéntica a la secuencia original del gen, para ello se puede hacer una amplificación del gen en el vector mediante PCR para garantizar que las secuencias de oligonucleótidos se unen al gen de interés y que el fragmento corresponde al tamaño del inserto, por corte con enzimas de restricción que corten el gen de interés que se encuentra en el vector y liberar un fragmento con un tamaño aproximado conocido. En este caso se usó la enzima *Eco* RI figura (10), panel B, esto se usa para confirmar que el gen de interés si está acoplado al vector y finalmente la secuenciación; este método de comprobación nos brinda la certeza que el fragmento que se le va a insertar a la planta en los pasos posteriores corresponde al gen de interés, y se obtuvo su secuencia sin cambios en las bases nitrogenadas. La integridad de la secuencia de las bases nitrogenadas es crucial para la síntesis de las proteínas con el aminoácido correcto; pues tan solo el cambio de una base puede alterar el aminoácido codificante, si este aminoácido está en el sitio catalítico se puede generar la síntesis de una proteína que no puede catalizar una reacción. En la naturaleza hay múltiples ejemplos de las consecuencias que pueden tener la delección, sustitución o inserción de un solo nucleótido como se observa en la tabla 3. Todo esto lo hace un paso crucial a la

hora de generar transgénicos que puede evitar problemas y retrasos en la investigación (Guénet J-L., 1995). En el caso del promotor+gen, aunque se observó un cambio en una de las bases nitrogenadas Figura (11), este cambio no compromete la integridad de la secuencia porque está en uno de los extremos que posteriormente se cortarán con enzimas de restricción para su integración al vector final que se integrará a la bacteria *Agrobacterium* y luego a la planta del jitomate (*Solanum lycopersicum*).

**Tabla 3.** Ejemplos de enfermedades generadas por mutaciones puntuales en la naturaleza

Enfermedad	Tipo de mutación	Consecuencias
Anemia falciforme	Sustitución (transversión A>T)	Cambia valina por ácido glutámico
Distrofia muscular de Duchenne	Delección	Provoca falta de distrofina, proteína importante para la función muscular
Fibrosis quística	Inserción	Cambia el marco de lectura del gen, provocando una traducción completamente diferente

Debido a la importancia de proveer alimento en cantidades necesarias a toda la población, la ingeniería genética se ha enfocado en proveer a las plantas resistencia a distintos tipos de estrés, entre los más importantes por su incremento en los últimos años es hacerlos resistentes al estrés salino debido al aumento de la salinidad de los suelos de cultivo; sin embargo, la mayoría intenta abordar el problema desde el nivel iónico al usar la sobreexpresión de genes que codifican enzimas que expulsan sodio fuera de la planta (Roy *et al.*, 2014). Estos genes funcionan con una red compleja de señalización: si se altera un solo gen de ella, la respuesta puede ser nula o parcial; un ejemplo es cuando se trata de modificar la familia de genes HKT que son transportadores de alta afinidad para el potasio y que bajo estrés salino contribuye a la salida del sodio del medio intracelular; si bien las plantas modificadas sí han incrementado la tolerancia a la salinidad del suelo, no todas son capaces de expulsar el sodio. Otra limitante es que la efectividad en la expresión de estos genes es de tipo celular específico.

Un punto importante a considerar es que muchos de los genes que se ocupan para hacer variedades tolerantes vienen de plantas halófilas, y la salinidad de los suelos se considera más que un estrés una condición constante de alta salinidad, por lo que algunas plantas halófilas han mostrado un desarrollo deficiente en medios sin estrés salino; al poner estos genes en plantas de cultivo responden de diferente forma según el grado de salinidad del

medio (Wani S., *et al* 2020). Finalmente, Das y Roychoudhury en 2014 mencionaron que un efecto del exceso de sodio en las plantas es la desactivación de canales iónicos, con lo que se inhibiría la función para la que se diseñaron este tipo de transgénicos.

Por otra parte, los trabajos que se enfocan en mejorar la respuesta al estrés salino a nivel tisular han mostrado mejores resultados; sin embargo, al usar generalmente genes exógenos que no se encuentran asociados a la planta de forma natural, hacen que la planta tenga una respuesta diferente a la esperada. También se ha intentado la manipulación genética de proteínas reguladoras o de los niveles de fitohormonas, pero estos ensayos han mostrado reducción del tamaño de la planta y un decremento de la cosecha, por lo que no se consideran una estrategia viable (Turan, Cornish y Kumar, 2012)

Si bien el gen *DhARO4* es exógeno para las plantas, su función no es del todo extraña, ya que todas las plantas y microorganismos sintetizan aminoácidos aromáticos a través de la ruta del ácido shikímico; esta ruta cuenta con siete reacciones comunes y a partir del corismato la ruta se diversifica según el organismo, en el caso de las plantas del corismato pasa a ser prefenato. Dentro de las siete reacciones comunes se encuentra la condensación del ácido carboxílico fosfoenolpiruvato (PEP) y el azúcar de 4-carbonos eritrosa-4-fosfato (E4P) llevada a cabo por la enzima 3-desoxi-D-arabinoheptulosa 7-fosfato (sintasa DAHP), el gen *DhARO4* codifica para esta enzima en la levadura *Debaryomyces hansenii*. Aunque estas enzimas se han clasificado en Clase I asociada a microorganismos y Clase II a plantas, hay cierta similitud entre ambas, algunos autores como Birck & Woodard, 2001 mencionan que la única diferencia entre ambas clases es si su actividad depende de un ion metálico o no; sin embargo, hay otros autores como Wu, Howe y Woodard, 2003 y Walker, Dunbar, Hunter, Nimmo y Coggins. 1996, que demuestran que esta clasificación no es restrictiva a microorganismos y plantas y que la diferencia no recae en el ion, en su lugar se plantea que la función es la misma debido a que se conserva el plegamiento de la proteína.

Otro detalle es que la función de esta enzima está ligada al estrés por salinidad tanto en la levadura como en la planta, demostrado por Calderón-Torres, M., Castro, D. E., Montero, P., & Peña, A. (2011) al encontrar que en la levadura *D. hansenii* aumentó la expresión de este al estar bajo estrés salino para generar tirosina que funciona como antioxidante ante la presencia de especies reactivas del oxígeno, tal como ya se ha reportado en otras investigaciones similares. Mientras que Ertugrul Filiz, Durmus Cetin y M. Aydın Akbudak (2019) analizaron los genes que se asocian al estrés salino en la planta de jitomate y encontraron que efectivamente hay un conjunto de genes asociados a aminoácidos aromáticos (tirosina, triptófano y fenilalanina) implicados en una serie de reacciones que se activan durante estrés tanto salino como de sequía. Con todo lo anterior se confirma que al



añadir el gen *DhARO4*, no se le estaría agregando un gen extraño a la planta que pueda alterar su metabolismo, pues la síntesis de tirosina es parte de sus respuestas naturales; sólo se le está aportando una copia extra del gen que le permita generar mayor cantidad de tirosina y hacerle frente a las ERO generadas bajo estrés y de esta forma permitir su desarrollo incluyendo los rendimientos de cosecha al evitar todos los daños moleculares ya descritos.

Por otro lado, se hace especial énfasis en la adición del promotor, ya que como se observó en el trabajo de Calderón-Torres *et al.* 2019, la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*) modificada con el gen *DhARO4* más su promotor original, expresó el gen, lo que sugiere que la planta puede tener factores transcripcionales que reconocen el promotor adicionado. Más aún, la planta del tabaco transformada con promotor y el gen *DhARO4* presentó un crecimiento óptimo en comparación a la planta de la cepa silvestre o cepa de referencia durante riego con NaCl 100 mM.

Finalmente, se sugiere que se considere como modelo biológico para la continuación de este proyecto la planta de jitomate comercial *Solanum lycopersicum*. Como se mencionó en la justificación, es un cultivo altamente importante para el país, a su vez está ampliamente demostrado que el umbral de tolerancia al sodio de este cultivo es de moderado a bajo, ya que se reconoce como una especie glicófita. Como mencionan Goykovic Cortés y Saavedra del Real en 2007 su tolerancia ronda los 2.4 dS, equivalentes a una concentración de 25 mM de sodio. Esto se comprueba en el trabajo de Morales *et al* en 2010 en donde crecen plantas de jitomate en tres distintas concentraciones salinas: 50, 100 y 200 mM y concluyen que hay efectos negativos en las tres concentraciones, pero se incrementan conforme incrementa la salinidad. En un trabajo previo (aún sin publicar) se corroboró que el crecimiento de plántulas de *Solanum lycopersicum* con riego salino al 50 mM es perjudicial porque reduce el tamaño del tallo y las hojas, por lo que la síntesis extra de tirosina en la planta podría reducir los daños de oxidación debidos al estrés salino.

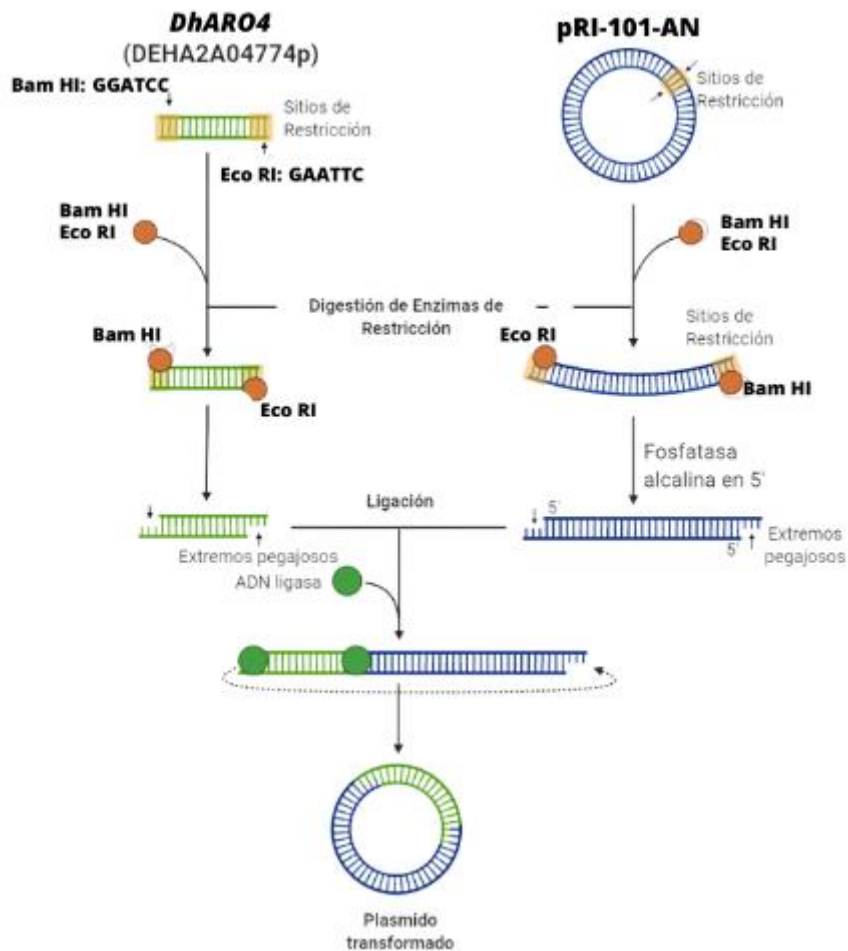
## **Conclusión**

Se logró aislar el gen *DhARO4* con los oligonucleótidos diseñados y con los control. Solo con los oligonucleótidos control se obtuvieron clonas exitosas del gen *DhARO4* y del gen con su promotor. Se determinó que las clonaciones fueron exitosas debido a que la digestión con enzimas de restricción de cada una de las construcciones del gen y el vector de clonación se obtuvo el fragmento esperado y en el análisis de comparación mediante alineamientos de la secuencia obtenida y la secuencia original del gen *DhARO4* tienen el cien por ciento de similitud.

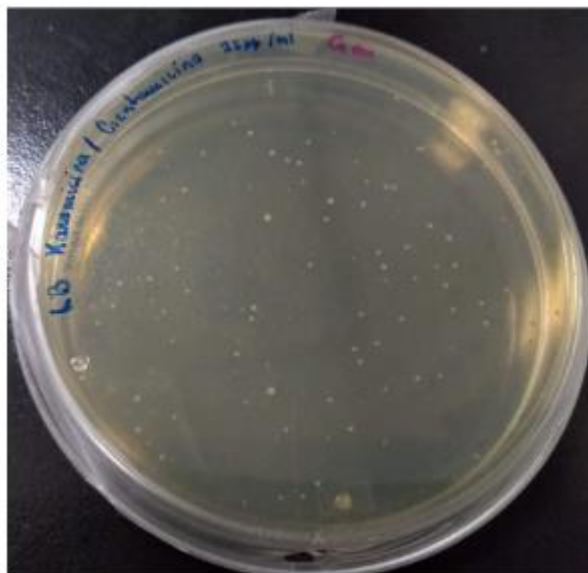
Con estos resultados se puede seguir la investigación, pasar las construcciones al vector de expresión pRI-101-AN, posteriormente a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* capaz de infectar a la planta modelo y finalmente obtener las plantas transgénicas para realizar todas las pruebas pertinentes y verificar si el gen *DhARO4* le permite a la planta hacerle frente al estrés generado por la salinidad de los suelos.

## **Perspectivas**

Después de la comprobación y verificación de la presencia del gen *DhARO4* y del gen con su promotor antes descrita, se procedió a insertarlo en el vector de expresión pRI-101-AN con las enzimas de restricción adicionadas a los oligonucleótidos ocupados (*Bam* HI y *Sac* I); sin embargo, el corte con la enzima de restricción *Sac* I, no generó los productos de restricción esperados, por lo que se empleó una segunda enzima de restricción, *Eco* RI, debido a que está flanqueando el sitio de inserción en el vector TOPO-XL-2, lo que permite liberarlo y se encuentra también en el vector pRI-101-AN, permitiendo su inserción Figura (13). Este fragmento se ligó y se insertó en la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* con la técnica de electroporación. Las bacterias transformadas se crecieron en cajas Petri con medio LB y los antibióticos Kanamicina y Gentamicina en una concentración de 35 y 30 ug/ml respectivamente. Por ahora solo se han tenido resultados positivos en el inserto del gen *DhARO4* como se observa en la figura (14).

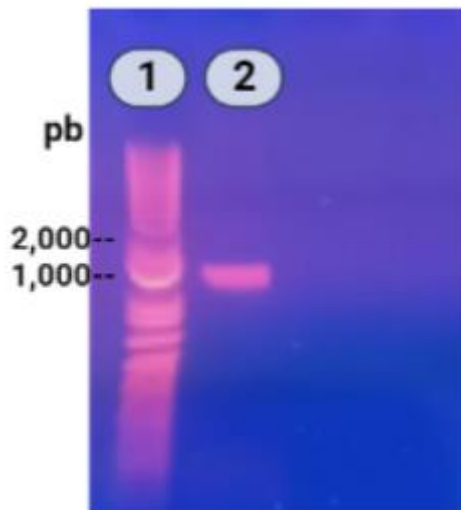


**Figura 13. Esquema del proceso de digestión y ligación.** Proceso de digestión por las enzimas de restricción *Bam* HI y *Eco* RI y su posterior ligación con el vector pRI-101-AN para obtener como producto un plásmido transformado: En color verde se resalta el inserto del gen *DhARO4*. El esquema se obtuvo con el programa biorender (<https://app.biorender.com>)



**Figura 14. Crecimiento de *Agrobacterium tumefaciens* transformada en placas con medio LB.** Colonias de *A. tumefaciens* transformada con el vector pRI-101-AN y la inserción de la región promotora más el gen *DhARO4*.

Se realizó la comprobación al extraer el ADN plasmídico y amplificar por PCR el fragmento del gen con los oligonucleótidos originales obteniendo la banda que coincide con el tamaño del producto (1107 pb) figura (15).



**Figura 15. Producto de aproximadamente 1000 pb correspondiente al gen *DhARO4* con los oligonucleótidos diseñados,** mediante electroforesis en gel de agarosa para ADN, carriles: 1) Estándar del tamaño del ADN en kilopares de bases (1 kb). 2) Producto de 1107 pb correspondientes al gen *DhARO4* con su promotor amplificado con los oligos control.

Una vez que se obtengan ambos productos: Promotor+gen y Gen, se realizará la verificación de la secuencia y si el alineamiento es óptimo se procederá a infectar a la planta por medio del método de micropropagación vegetativa.

## Referencias

Al-Mohammad Maher y Al-Taey Duraid. (2019). Effect of tyrosine and sulfur on growth, yield and antioxidant compounds in arugula leaves and seeds. *Research on Crops*, (20), 116-120. [10.31830/2348-7542.2019.016](https://doi.org/10.31830/2348-7542.2019.016)

Avello, Marcia y Suwalsky, Mario. (2006). Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. *Atenea* (Concepción), (494), 161-172. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-04622006000200010>

Benítez Burraco A. (2005). Avances recientes en biotecnología vegetal e ingeniería genética de plantas. Editorial Reverté, S.A.

Bimal K.P. y Harun R. (2017). Chapter Seven - Nonstructural Adaptation. Editor(s): Bimal Kanti Paul, Harun Rashid. *Climatic Hazards in Coastal Bangladesh*. Butterworth-Heinemann, Pages 209-256.

Birck, M., Woodard, R. (2001). Aquifex aeolicus 3-Deoxy-D-manno-2-Octulosonic Acid 8-Phosphate Synthase: A New Class of KDO 8-P Synthase?. *J Mol Evol* (52), 205–214. <https://doi.org/10.1007/s002390010149>

Bresler E., McNeal B.L. y Carter D.L. (2012). Saline and Sodic Soils: Principles-Dynamics-Modeling. (10) de *Advanced Series in Agricultural Sciences*. Springer Science & Business Media, 236.

Calderón-Torres, M., Castro, D. E., Montero, P. y Peña, A. (2011). DhARO4 induction and tyrosine nitration in response to reactive radicals generated by salt stress in *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* (Chichester, England), 28(10), 733–746. <https://doi.org/10.1002/yea.1903>

Calderón-Torres, M., López-Estrada, E., Romero-Maldonado, A., Rosales-Mendoza, S., y Murguía-Romero, M. (2019). The Heterologous Expression Of The *Debaryomyces hansenii DhARO4* Gene In *Nicotiana tabacum* Improves Growth Yield, Even After Inhibition By Saline Stress. *Revista Mexicana De Ingeniería Química*, 18(2), 729-736. <https://doi.org/10.24275/uam/izt/dcbi/revmexingquim/2019v18n2/Calderon>

Calderón-Torres, M., Peña, A., y Thomé, P. E. (2006). DhARO4, an amino acid biosynthetic gene, is stimulated by high salinity in *Debaryomyces hansenii*. *Yeast* (Chichester, England), 23(10), 725–734. <https://doi.org/10.1002/yea.1384>

Das Kaushik, Roychoudhury Aryadeep. (2014). Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front. Environ. Sci.* 02. URL=<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2014.00053>

De Guglielmo C. y Fernandez Da Silva. (2016). Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas. *Rev. Colomb. Biotecnol.* (18) No. 2. pp. 119-128. DOI: [10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61529](https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v18n2.61529)

De la Torre A. (2020). Estudio comparativo del efecto del estrés salino en plantas de tomate. Influencia de la variabilidad genotípica. Tesis Doctoral Universidad de Granada. España.

Díaz Granados, Cristina, y Chaparro-Giraldo, Alejandro. (2012). Métodos De Transformación Genética De Plantas. Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica, 15(1), 49-61. Retrieved December 31, 2022, from [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0123-42262012000100007&lng=en&tlng=es](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262012000100007&lng=en&tlng=es).

Endo T., Sadahiro Yamamoto, Juan A. Larrinaga, Hideyasu Fujiyama y Toshimasa Honna. (2011). Status and Causes of Soil Salinization of Irrigated Agricultural Lands in Southern Baja California, Mexico. Applied and Environmental Soil Science, vol., Article ID 873625, 12. <https://doi.org/10.1155/2011/873625>

Ertugrul Filiz, Durmus Cetin y M. Aydın Akbudak. (2019). Aromatic amino acids biosynthesis genes identification and expression analysis under salt and drought stresses in *Solanum lycopersicum* L., Scientia Horticulturae, (250), 127-137. ISSN 0304-4238, <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.02.044>.

FAO. (1992). World Fertilizer use Manual, IFA, París, 632p. Página Web

<http://www.fertilizer.org>

FAO. (2010). Generalidades del suelo. Accessed on 31-04-2023

[https://www.fao.org/fishery/docs/CDrom/FAO\\_Training/FAO\\_Training/General/x6706s/x6706s01.htm#top](https://www.fao.org/fishery/docs/CDrom/FAO_Training/FAO_Training/General/x6706s/x6706s01.htm#top)

FAO. (2021). Salt-affected soils. Accessed on 05-05-2022. <http://www.fao.org/soils-portal/soil-management/management-of-some-problem-soils/salt-affected-soils/more-information-on-salt-affected-soils/en/>.

<https://www.fao.org/soils-portal/soil-survey/soil-maps-and-databases/global-map-of-salt-affected-soils/ru/>

Flieger, J., Flieger, W., Baj, J. y Maciejewski, R. (2021). Antioxidants: Classification, Natural Sources, Activity/Capacity Measurements, and Usefulness for the Synthesis of Nanoparticles. Materials (Basel, Switzerland), 14(15), 4135. <https://doi.org/10.3390/ma14154135>

González-Hernández, J. C. y Flores-Herrejón, R. D. (2022). *Debaryomyces hansenii* levadura no-convencional y su potencial Biotecnológico. Milenaria, Ciencia Y Arte, (20), 18–21. Recuperado a partir de <http://www.milenaria.umich.mx/ojs/index.php/milenaria/article/view/271>

Goykovic Cortés, Vitelio y Saavedra del Real, Gabriel. (2007). Algunos Efectos de la Salinidad en el Cultivo del Tomate y Prácticas Agronómicas de su Manejo. Idesia (Arica), 25(3), 47-58. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292007000300006>

Greene, R., Timms, W., Rengasamy, P., Arshad, M. y Cresswell, R. (2016). Soil and Aquifer Salinization: Toward an Integrated Approach for Salinity Management of Groundwater. In: Jakeman, A.J., Barreteau, O., Hunt, R.J., Rinaudo, J.D., Ross, A. (eds) Integrated Groundwater Management. Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-23576-9\\_15](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23576-9_15)

Guénet J-L. (1995). Animal Models of Human Genetic Disease. In: "Gene targeting" ed. Manuel Vega, CRC Press, Boca Raton, 149-166.

Hassani, A., Azapagic, A. y Shokri, N. (2021). Global predictions of primary soil salinization under changing climate in the 21st century. Nat Commun (12), 6663. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26907-3>

Kotha, R. R., Tareq, F. S., Yildiz, E. y Luthria, D. L. (2022). Oxidative Stress and Antioxidants—A Critical Review on In Vitro Antioxidant Assays. Antioxidants, 11(12), 2388. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/antiox11122388>

Maeda H. y Dudareva N. (2012). The Shikimate Pathway and Aromatic Amino Acid Biosynthesis in Plants. Annu. Rev. Plant Biol. (63), 73-105. Downloaded from [www.annualreviews.org](http://www.annualreviews.org)

Metternicht G. y Zinck A. (2008). Remote Sensing of Soil Salinization : Impact on Land Management. CRC Press, Baton Rouge, ISBN: 9781420065039

Morales, D, Dell'Amico, J. Ml, Rodríguez, P, Torrecillas, A, y Sánchez-Blanco, María de J. (2010). Efecto del Estrés por NaCl en el Crecimiento y las Relaciones Hídricas en Plantas de Tomate (*Solanum Lycopersicum L.*) Durante El Período Vegetativo. Cultivos Tropicales, 31(4), 00. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0258-59362010000400005&lng=es&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000400005&lng=es&tlng=es).

Morales, D., Rodríguez, P., Sánchez-Blanco, M. D. J. y Torrecillas, A. (2002). Respuesta A La Salinidad De Tres Variedades De Tomate (*Lycopersicon esculentum Mill.*). Cultivos Tropicales, 23(3), 71-76.

Neyra Recky, Serrano, Dántola y Lorente. (2021). Oxidation of tyrosine: Antioxidant mechanism of L-DOPA disclosed. Free Radical Biology and Medicine. (165), 360-367. ISSN 0891-5849.

Parthasarathy Anutthaman, Cross Penelope J., Dobson Renwick C. J., Adams Lily E., Savka Michael A. y Hudson André O. (2018). A Three-Ring Circus: Metabolism of the Three Proteogenic Aromatic Amino Acids and Their Role in the Health of Plants and Animals. Frontiers in Molecular Biosciences. 5. doi:10.3389/fmolb.2018.00029

Phillips, T. (2008) Genetically modified organisms (GMOs): Transgenic crops and recombinant DNA technology. Nature Education 1(1), 213. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/genetically-modified-organisms-gmos-transgenic-crops-and-732/>

Roy Stuart J, Sónia Negrão, Mark Tester. (2014). Salt resistant crop plants. Current Opinion in Biotechnology. (26), 115-124. ISSN 0958-1669, <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.12.004>.

Sacerdot C, Casaregola S, Lafontaine I, Tekaiia F, Dujon B. y Ozier-Kalogeropoulos O. (2008). Promiscuous DNA in the nuclear genomes of hemiascomycetous yeasts. FEMS Yeast Res. 8(6), 846-57. doi: 10.1111/j.1567-1364.2008.00409.x

Saeed, A., Saleem, M. F., Zakria, M., Anjum, S. A., Shakeel, A. y Saeed, N. (2011). Genetic variability of NaCl tolerance in tomato. Genetics and molecular research : GMR, 10(3), 1371–1382. <https://doi.org/10.4238/vol10-3gmr1121>

Salazar Montes A.M., Sandoval Rodríguez A.S. y Armendáriz Borunda J.S. (2013). Vectores de clonación y expresión. Salazar Montes A.M., Sandoval Rodríguez A.S. y Armendáriz Borunda J.S. Biología Molecular Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud. 127-138. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C. V.

Secretaria de Agricultura y Desarrollo Rural. (2021). Mapa Agrícola de afectación por salinidad en México. <https://www.gob.mx/agricultura/acciones-y-programas/mapa-agricola-de-afectacion-por-salinidad-en-mexico>

Soil Science Glossary Terms Committee. (2008). Glossary of soil science terms (Soil Science Society of America, ASA-CSSA-SSSA,).

Stavi I., Thevs N. y Priori S. (2021). Soil Salinity and Sodicity in Drylands: A Review of Causes, Effects, Monitoring, and Restoration Measures. Frontiers in Environmental Science. (9) <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fenvs.2021.712831>

Suárez, R., Calderón, C. y Iturriaga, G. (2009), Enhanced Tolerance to Multiple Abiotic Stresses in Transgenic Alfalfa Accumulating Trehalose. Crop Sci. (49) 1791-1799. <https://doi.org/10.2135/cropsci2008.09.0573>

Ullah A., Bano A. y Khan N. (2021). Climate Change and Salinity Effects on Crops and Chemical Communication Between Plants and Plant Growth-Promoting Microorganisms Under Stress. Frontiers in Sustainable Food Systems. V5 <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fsufs.2021.618092>

Turan, S., Cornish, K. y Kumar, S. (2012) Salinity Tolerance in Plants: Breeding and Genetic Engineering. Australian Journal of Crop Science, 6, 1337-1348. [http://www.cropj.com/turan\\_6\\_9\\_2012\\_1337\\_1348.pdf](http://www.cropj.com/turan_6_9_2012_1337_1348.pdf)

Walker GE, Dunbar B, Hunter IS, Nimmo H.G. y Coggins JR. (1996). Evidence for a novel class of microbial 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase in *Streptomyces coelicolor* A3(2), *Streptomyces rimosus* and *Neurospora crassa*. Microbiology (Reading, Engl.) 142 ( Pt 8), 1973-82.

Wani, S. H., Kumar, V., Khare, T., Guddimalli, R., Parveda, M., Solymosi, K., Suprasanna, P. y Kavi Kishor, P. B. (2020). Engineering salinity tolerance in plants: progress and prospects. Planta, 251(4), 76. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03366-6>



Wilches Flórez, Á. M., (2010). La biotecnología en un mundo globalizado. Revista Colombiana de Bioética, 5(2),164-169.[fecha de Consulta 19 de Diciembre de 2022]. ISSN: 1900-6896. Recuperado de: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=189218186016>

William J. Thieman. y Michael A. Palladino. (2010). Introducción a la biotecnología. Pearson Educación, S.A. ISBN: 978-84-7829-117-5 406 p.

Wu J, Howe D.L. y Woodard RW. (2003). *Thermotoga maritima* 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate 7-phosphate (DAHP) synthase: the ancestral eubacterial DAHP synthase? J. Biol. Chem. 278, 27525-31.