

DESCRIPCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES DEHIDRINAS EN CHILE

PIQUÍN (*Capsicum annum var. glabriusculum*)

JOSÉ MARCIANO DE LA CRUZ OLIVARES

TESIS

Presentada como requisito parcial para

obtener el Grado de:

MAESTRO EN CIENCIA EN HORTICULTURA



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO
NARRO**

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México

Diciembre de 2013

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO

DESCRIPCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES DEHIDRINAS EN CHILE
PIQUÍN (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*)

TESIS Por:

JOSÉ MARCIANO DE LA CRUZ OLIVARES

Elaborada bajo la supervisión del comité particular de asesoría y aprobada
como requisito parcial, para optar al grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

COMITÉ PARTICULAR

Asesor principal:


Dr. Edmundo Mario Rodríguez Campos

Vocal:

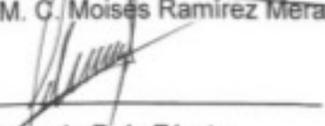

Dr. Valentin Robledo Torres

Vocal:


Dra. Araceli Aguilar Meléndez

Vocal:


M. C. Moisés Ramírez Meraz


Dr. Fernando Ruíz Zárate
Subdirector de Posgrado

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
Diciembre de 2013.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, por darme la oportunidad de formarme profesionalmente.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo económico oportuno para la realización de la Maestría.

Al Dr. Edmundo Mario Rodríguez Campos por transmitir sus conocimientos y experiencias conmigo, por sus valiosos comentarios para desarrollar y terminar este trabajo y por motivar siempre el progreso profesional.

A mis asesores: Dra. Araceli Aguilar Meléndez; M.C. Moisés Ramírez Meraz, por sus comentarios y contribuciones para el termino de esta investigación.

Al Dr. Horacio Villalón Mendoza de la UANL por proporcionar las semillas de chile piquín. Al Dr. Gerardo Rafael Argüello Astorga del IPICYT por recibirme, por sus recomendaciones y tips dentro de laboratorio.

A mis colegas y amigos en el laboratorio de Agrobiotecnología de Ciencias Básicas: Dagoberto Flores, Victor, Isaac y Marco Aurelio. A mis compañeros de grupo y de camaradería: Oscar Avila, Gloria Laura, Dayli, Victor Camacho, Alfredo...A todas aquellas personas que de alguna forma permitieron mi desarrollo académico y personal durante la estancia en la UAAAN.

DEDICATORIA

A mi madre **Graciela Olivares Sánchez**, por traerme al mundo y brindarme su inagotable e inigualable amor y por su apoyo moral, además de darme sus peculiares consejos con un toque de sarcasmo. Le agradezco infinitamente por enseñarme a ser un persona que nunca se da por vencido.

A mi padre **Eusebio De la Cruz Tejeda**, que me enseñó que las cosas materiales son pasajeras y las cosas del corazón perduran para siempre. Le agradezco mucho por sus consejos y por ser más que un padre, por ser el amigo ideal y a la vez un ejemplo a seguir por su carácter, esfuerzo y sabiduría.

A mis hermanos **Ana Belén, Julia Patricia y Eusebio**, por darme apoyo moral, por confiar en mi y por todos los tantos momentos gratos. A mis sobrinos **Uriel y Danna y Aylin**, que colmaron mi vida de ternura.

Siempre los tengo en mi corazón por eso son mi motivación.

COMPENDIO

DESCRIPCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE GENES DEHIDRINAS EN CHILE

PIQUÍN (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*)

POR

JOSÉ MARCIANO DE LA CRUZ OLIVARES

MAESTRO EN CIENCIAS

EN HORTICULTURA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, Diciembre de 2013.

Dr. Edmundo Mario Rodríguez Campos.- Asesor

Palabras Clave: Proteínas LEA, sequía, transcritos, dehidrinas, Tas14, transcripción

Se compararon plantas de dos poblaciones de chile piquín, que crecen en condiciones de humedad contrastantes, en cuanto a su respuesta a condiciones de estrés hídrico en invernadero e *In vitro*. Los tratamientos consistieron en suspender el riego durante 16 días más un riego de recuperación y una

evaluación final a 19 días. Las plantas control se regaron normalmente, se midió la tensión de agua en el suelo, potencial hídrico en hojas antes del amanecer y el contenido relativo de agua en las hojas. Las condiciones de estrés hídrico *In vitro* solo consistieron en poner hojas de plantas de chile a desecar en cajas Petri. En ambos experimentos (en invernadero e *In vitro*) se hizo análisis de la expresión por RT-PCR. También se hizo la caracterización del gen de dehidrina Tas14 en plantas de chile piquín adultas, esto se realizó haciendo Genome Walking y un posterior análisis bioinformático de la secuencia. Los datos de potencial hídrico y contenido relativo de agua en las hojas indicaron que la población de Coahuila perdió menos agua respecto a la población de Veracruz. En el análisis de expresión de dehidrinas solo se observaron diferencias en el gen KS18 que si parece responder al gradiente de la pérdida de agua en condiciones de desecación de plantas de chile piquín. Los condiciones en las que se realizó el ensayo de sequía en plantas de chile y de acuerdo a los parámetros fisiológicos medidos determinan que el estrés hídrico impuesto fue severo, sin embargo las plantas recurren a otros mecanismos diferentes al de expresión de dehidrinas analizadas. Con la técnica de Genome Walking se obtuvo una secuencia de Tas14 de 610 pb, esta secuencia se ensambló con un cDNA de la base de datos de CINVESTAV, lo que da como resultado una secuencia de 1648 pb que contiene a toda la EST más el intrón detectado, la secuencia incluye una parte del promotor, la caja TATA está en la posición 464 y esto da la oportunidad de detectar algunos

factores de regulación de transcripción.

ABSTRACT

**EXPRESSION OF FOUR DEHYDRIN GENES IN “CHILE PIQUÍN” (*Capsicum
annuum var. glabriusculum*) UNDER WATER STRESS**

BY

JOSÉ MARCIANO DE LA CRUZ OLIVARES

MASTER OF SCIENCE

IN HORTICULTURE

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA

ANTONIO NARRO

Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, Diciembre de 2013.

Dr. Edmundo Mario Rodríguez Campos.-Adviser

Index words: LEA proteins, drought, transcripts, dehydrins, Tas14, transcription.

The aim study was to compare two populations of “chile piquin” to test the

response to water stress in greenhouse and *In vitro*. The treatments consisted in stop the watering during 16 days plus a three-day recovery period after watering. The control plants were irrigated every day. Several parameters were measured were water tension within the soil, leaf water potencial before sunrise and leaf relative water content. The *In vitro* water stress exoeriment was imposed to the chile plants by simply letting the chile leaves to dehydrate in Petri dishes. The Capsicum *Dhn1*, *Dhn13*, *Tas14* and *KS18* gene expression was analyzed by RT-PCR in both experiments. The data of water stress and relative water content in leaves indicated that the population of Coahuila lost less water in relation to the population of Veracruz. Within the analysis of dehydrin expression, only *KS18* seems to be a water stress responsive gene under the conitions studied. The water stress accomplished was severe according to the conditions imposed and the physiological parameters measured; therefore, we concluded that chile piquin plants utilize different mechanisms to cope with water stress than those in which the dehydrins analyzed in this paper are involved.

Índice de contenido

II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
Las dehidrinas (DHNs).....	6
Clasificación de las dehidrinas.....	7
Las dehidrinas en plantas.....	8
El chile piquín.....	10
Botánica del chile piquín.....	10
Dispersión y distribución geográfica.....	11
III. ARTICULO I.....	13
EXPRESIÓN DE 4 DEHIDRINAS EN CHILE PIQUÍN (<i>Capsicum annuum</i> var. glabriusculum) bajo condiciones de estrés hídrico.....	13
Resumen.....	15
Abstract.....	15
Introducción.....	16
Material y métodos.....	19
Resultados.....	23
Discusión.....	26
Referencias Bibliográficas.....	30
IV. ARTICULO II.....	41
CARACTERIZACIÓN DE LAS DEHIDRINAS Tas14 Y Ks18 EN CHILE.....	41
INTRODUCCIÓN.....	42
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	51
CONCLUSIONES.....	62
LITERATURA CITADA.....	63

Índice de figuras

Figura 1. Arreglo de los distintos motivos en las DNHs (80-620 aminoácidos). Cada uno de los cinco subgrupos contiene una representación esquemática de la disposición de los aminoácidos (tomado de Battaglia et al., 2008).	8
---	---

Artículo I

Índice de figuras

Figura 1. Gradiente de la pérdida de agua en suelo de plantas de chile piquín de población de Veracruz y Coahuila.....	36
Figura 2. Potencial hídrico antes del amanecer en plantas de chile piquín de la población de Veracruz y Coahuila.....	37
Figura 3. Contenido relativo de agua en las hojas en plantas de chile piquín de la población de Veracruz y Coahuila.....	38
Figura 4. Expresión de Dhns por RT-PCR en plantas de chile piquín de la población de Veracruz y Coahuila bajo condiciones de sequía en invernadero. Los porcentajes representan el contenido relativo de agua en las hojas de las plantas (CRA).....	39
Figura 5. Expresión de Dhns por RT-PCR en chile piquín de la población de Veracruz y Coahuila bajo condiciones de estrés hídrico In vitro.....	40

Índice de tablas

Tabla 1. Oligonucleótidos cebadores utilizados. En cada par, la secuencia superior corresponde al directo, la inferior al complementario. La clave en la secuencia base corresponde a la del Genbank.....	35
---	----

Artículo II

Índice de figuras

Figura 1. Diagrama de flujo del protocolo Genome Walking™. La figura muestra al final un resultado típico generado con bibliotecas Genome Walking en humano utilizando primers específicos de genes.	46
Figura 2. Electroforesis de productos de la PCR primaria en el procedimiento de “genome walking” se especifica en cada carril el origen de cada muestra, de que dehidrina procede y a que lado del gen (5' o 3') corresponde, así como de cual biblioteca de restricción fue obtenida. En el primer carril, MM son marcadores de peso molecular.	51
Figura 3. Electroforesis de productos de PCR secundaria. En el primer carril, MM son marcadores de peso molecular. La identificación de cada muestra es similar a la figura anterior.....	52
Figura 4. Electroforesis de clones de Tas14 5' y Ks18 3'. MM son marcadores de peso molecular. T= Tas14 5', K=Ks18 3'. Las flechas indican los insertos liberados por EcoR I del plasmido.....	55
Figura 5. Secuencia de la dehidrina Tas14 obtenida por Genome Walking y ensamblada con el software CodonCoder. Los colores indican la estructura del gen.....	57
.....	58
Figura 6. Secuencia proteica deducida de la secuencia del gen tas14. Las secuencia marcadas en negritas son: TDEYGNR segmento Y, SDSSSSS es el segmento S, KKGIKEKIMEKMPG es un segmento K y EKKGMMDKIKDKIPG es otro segmento K.....	58
Figura 7. Alineamiento múltiple entre las secuencias proteicas de la dehidrina Tas14 de chile (CaTas14), de tomate (SlTas14) y papa (StTas14). Los segmentos característicos están marcados. El segmento Y en negritas, el segmento S en negritas y cursivas y el segmento K en negritas y subrayado. Las posiciones completamente conservadas están marcadas con asterisco. Las sustituciones conservadas están marcadas con dos puntos y las semiconservadas con un punto.....	59

Figura 8. Comparación de elementos cis en la región promotora de Tas14 en tomate y chile. En tomate se analizaron más o menos 1000 pb río arriba. En chile se analizaron más o menos 400 pb.....60

I. INTRODUCCIÓN

El chile se cultiva en casi todo el territorio nacional y a la vez México es centro de origen de la especie *Capsicum annuum* L., es donde se cultivan la mayor variedad de chiles de esta especie. La producción nacional en el 2009 fue de 2,059 (en miles de toneladas), Chihuahua destaca con una producción del 25%, en los cuales el 31% de la producción fue chile jalapeño, el 10.9% fue de chile serrano, 9.7% de chile poblano y 8.1% fue de morrón (SIAP, 2010). Estas variedades son de las más importantes en términos económicos y su contraparte silvestre son las poblaciones pertenecientes a *Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (Duna) Heiser & Pickersgill, que se encuentran distribuidas en todo el territorio mexicano (Nee, 1985). Los chiles silvestres mantienen la mayor diversidad genética y una parte de ella fue transmitida a los chiles cultivados (Aguilar-Meléndez *et al.*, 2009).

Las plantas son organismos sésiles por lo tanto es importante entender la función de los genes que pudieran estar relacionados con su adaptación para sobrevivir a condiciones abióticas cambiantes. Debido a que las plantas silvestres como los chiles han tenido que sobrevivir en ecosistemas diversos con disponibilidad cambiante de recursos (agua, luz, etc.), se estima que existe una gran diversidad genética que le permite a las plantas sobrevivir e ambientes contrastantes como el semidesierto de Coahuila y el trópico húmedo de

Veracruz. Esta información genética de los chiles silvestres podría servir en el futuro para tomar decisiones relacionadas al manejo de poblaciones o realizar fitomejoramiento (clásico o asistido por marcadores moleculares) en los chiles domesticados de la especie *C. annuum* L. que se cultivan en todo el mundo.

El rendimiento se ve afectado por la incidencia de diferentes tipos de estrés donde las condiciones ambientales desfavorables pueden disminuir hasta en un 70% el potencial genético de las plantas (Boyer, 1982). Existen varios tipos de estreses abióticos, pero uno de los que causa mayor problema a los agricultores, es el estrés hídrico en cultivos a campo abierto debido a las sequías. Para hacer frente al estrés ambiental las plantas modifican eventos específicos del desarrollo, cambios que pueden incluir la variación en el programa de expresión de genes. Entre otras respuestas las plantas pueden producir cambios en el tipo, cantidad o actividad de determinadas proteínas de la planta, generando componentes útiles para adaptarse a las nuevas condiciones (Sunkar *et al.*, 2007). Esto implica la activación o inactivación de los genes a partir de los cuales estas proteínas son sintetizadas. Algunas de estas proteínas específicas son las dehidrinas (Close, 1996) que se ha comprobado responden a condiciones de estrés hídrico.

Las dehidrinas (DHNs) son parte de un grupo extenso de proteínas conocidas como LEA (Late Embryogenesis Abundant), las cuales se caracterizan por su alta hidrofiliidad, por permanecer en solución a temperaturas de ebullición y tener poca y a veces nula estructura secundaria. Las DHNs típicamente se acumulan en tejidos vegetativos en respuesta a déficit hídrico, como baja

temperatura, sequía, salinidad o aplicación de ácido abscísico y en las semillas, durante la fase tardía de embriogénesis, por lo que se les asocia con un papel de protección o estabilizador de membranas y proteínas (Close, 1996; Campbell y Close, 1997; Close, 1997).

La regulación de la expresión de los genes ocurre en diferentes niveles, el de la transcripción, regularmente es el nivel más importante. Pero existen otros puntos de regulación, que incluyen las vías de procesamiento de los ARN mensajeros, el transporte de los mismos una vez maduros, su traducibilidad, y por último las modificaciones postraduccionales y transporte de la proteína sintetizadas (Sunkar et al., 2007).

Se ha documentado que algunas variedades de chiles muestran características adaptativas a bajos potenciales hídricos (Nieto-Garibay *et al.*, 2010) por lo que resulta interesante conocer que ocurre con los genes de dehidrinas en el chile piquín (*C. annuum* var. *glabriusculum*). En la actualidad no existe un estudio de las dehidrinas, desde el punto de vista de los procesos de regulación de la expresión génica en plantas del género *Capsicum*. En el presente trabajo se estableció como objetivo evaluar la expresión de los genes para dehidrinas del chile piquín de dos poblaciones sometidas a condiciones de estrés hídrico y la caracterización del gen de la dehidrina Tas14.

OBJETIVOS

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la expresión de los genes para cuatro dehidrasas del chile piquín de dos poblaciones sometidas a estrés hídrico.
- Describir el gen de la dehidrasa Tas14 por medio del estudio de su secuencia en chile (*Capsicum annuum*).

HIPÓTESIS

El estrés hídrico provoca una expresión diferencial de los genes para dehidrasas entre las poblaciones de estudio.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

El estrés en plantas

Las plantas (silvestres y cultivadas) están expuestas constantemente a estreses ambientales. El estrés se define como un factor externo que ejerce una influencia negativa sobre la planta, que puede ser biótico (malas hierbas, patógenos e insectos depredadores) o abiótico (clima, sequía). El estrés se mide por sus efectos en diferentes parámetros, como son supervivencia de la planta, el rendimiento del cultivo, crecimiento (acumulación de biomasa) o los procesos de asimilación primaria (incorporación de CO₂ y minerales) (Taiz y Zeiger, 2006).

Los factores ambientales tales como la sequía, salinidad y temperaturas extremas afectan significativamente la productividad de los cultivos y causan pérdidas económicas en la agricultura (Rodríguez *et al.*, 2005; Beck *et al.*, 2007). El efecto de la sequía se manifiesta cuando el contenido de agua en la planta disminuye, las células pierden turgencia y aumenta la concentración de solutos en las células, esto afecta también a las actividades que dependen de la turgencia, como la expansión foliar y la elongación radicular. Otro mecanismo, llamado cierre hidroactivo, tiene lugar cuando la hoja o las raíces están deshidratadas (Taiz y Zeiger, 2006). A nivel bioquímico como respuesta al estrés hídrico las plantas inician una cascada de señales que activan factores

de homeostasis. Por ejemplo, el estrés osmótico activa un conjunto de proteín-cinasas que inducen mecanismos de homeostasis osmótica y/o respuesta a destoxificación (Rodríguez *et al.*, 2005). Otro ejemplo en algunas plantas es el aumento en el contenido de prolina en hojas, azúcar-alcoholes (como por ejemplo, el sorbitol y el manitol), glicina betaina, entre otros, que juega un papel importante en los procesos de ajuste osmótico (Parra *et al.*, 1999); Caramelo & Lusem, 2009).

Desde un nivel bioquímico en las plantas ocurren cambios, como la disminución parcial o total de la síntesis de ciertas proteínas y al mismo tiempo habrá una inducción de la síntesis de otras proteínas como las dehidrinas (Close, 1996).

Las dehidrinas (DHNs)

Las dehidrinas son proteínas que pertenecen al grupo de las llamadas LEA (Late Embryogenesis Abundant). Estas proteínas aparecen y se acumulan en la fase tardía de la embriogénesis (como su nombre lo indica), cuando las semillas pierden la mayor parte del contenido de agua, también en los tejidos vegetativos cuando la planta se somete a déficit hídrico, como ocurre en la sequía, alta salinidad o bajas temperaturas, por lo que se les asocia con un papel de protección o estabilizador de membranas y otras proteínas (Close, 1996; Campbell y Close, 1997; Close, 1997).

Las dehidrinas se caracterizan por ser altamente hidrofílicas, permanecer en solución a temperatura de ebullición y por tener poca o nula estructura secundaria, poseen una región conservada de 15 aminoácidos rico en lisinas,

conocido como segmento K. También tienen una serie continua de residuos de serina, el segmento S y un segmento llamado Y. La presencia y número de cada uno de estos segmentos permiten agrupar a las diferentes dehidrasas (Campbell y Close, 1997).

Clasificación de las dehidrasas

La presencia y disposición de las secuencias *motif*, permite clasificar a las dehidrasas en el grupo II de las proteínas LEA. El número y el orden de segmentos Y-, S- y K- define diferentes DHNs en cinco subgrupos: Y_nSK_n , Y_nK_n , SK_n , K_n y K_nS (Campbell y Close, 1997; Svensson *et al.*, 2002).

El segmento K es un *motif* muy conservado de 15 aminoácidos (secuencia consenso: EKKGIMDKIKEKLPG) que son capaces de formar un α -hélice anfipática en un medio hidrofóbico. Los anticuerpos contra esta secuencia de aminoácidos se han utilizado para detectar dehidrasas en una amplia gama de plantas (Close *et al.*, 1993).

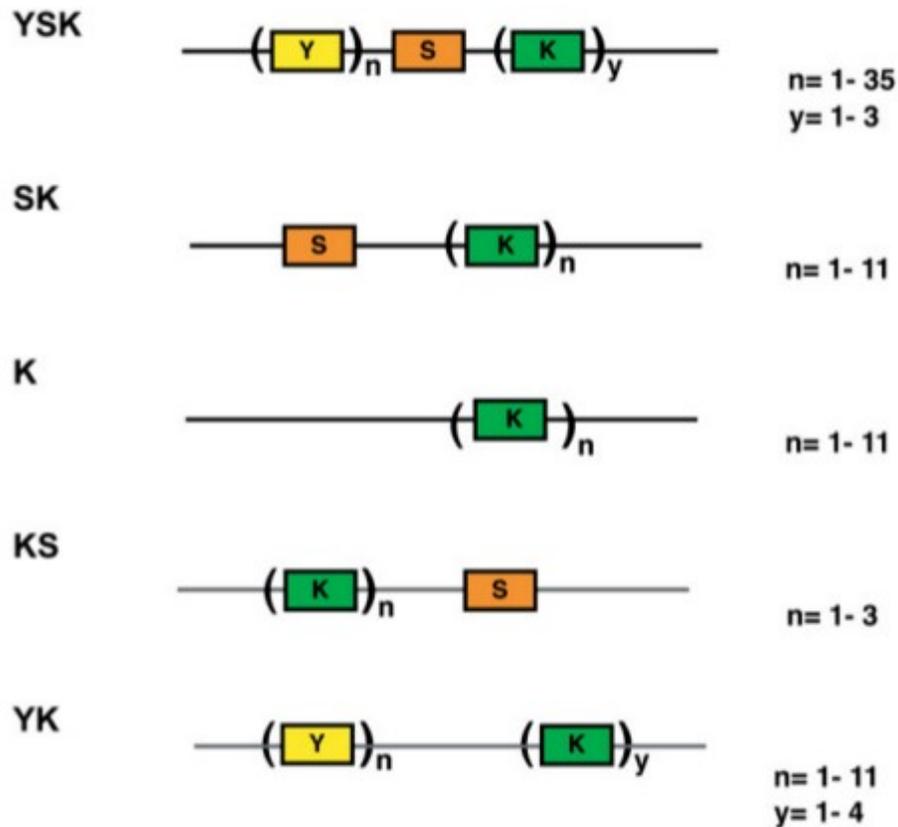


Figura 1. Arreglo de los distintos motivos en las DNHs (80-620 aminoácidos). Cada uno de los cinco subgrupos contiene una representación esquemática de la disposición de los aminoácidos (tomado de Battaglia *et al.*, 2008).

Las dehidrinas en plantas

Se ha documentado ampliamente una correlación positiva entre la acumulación de las dehidrinas y la adaptación a la deshidratación celular en las plantas.

Chung *et al.* (2003) analizaron la expresión del gen *Dhn-1* en un experimento con hojas de chile de una variedad coreana (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang), a las que sometieron a tratamiento *In vitro* de estrés hídrico, estrés por frío,

estrés salino y aplicación de ABA por 24 h. Los autores encontraron que el gen *dhn-1* está regulado por varios tipos de estrés en las plantas de Chile. En particular, en su experimento encontraron que la presencia de transcritos fue evidente desde las 2 h de impuesto el estrés hídrico y la expresión aumentó gradualmente a las 4 h, a las 8 h alcanzó niveles muy altos y a las 24 h el nivel de expresión disminuyó.

Rodríguez *et al.* (2005) encontraron en cebada que el gen *dhn-13* codifica una dehidrina tipo KS, con un nivel de expresión basal bajo condiciones normales y la expresión se elevó bajo condiciones de estrés por frío. Los autores sugieren profundizar las investigaciones en *dhn-13* ya que puede estar relacionada con un papel importante en la aclimatación al frío en plantas.

Godoy *et al.* (1990) sometieron a plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. Rutgers) a estrés salino y aplicación de ABA por 24 h, con el análisis por Southern blot encontraron que en hojas de tomate el mRNA de *Tas-14* incrementa sustancialmente con el tratamiento de estrés salino que con la aplicación de ABA. Los autores sugieren que la inducción sistemática de *Tas-14* por ABA y estrés salino pueden jugar un papel importante en la respuesta de las plantas a estrés por agua y por salinidad.

El estudio de las dehidrinas puede conducir al uso de estos genes y sus productos como marcadores moleculares para respuesta a estrés por diversos factores abióticos como sequía, frío, entre otros. Pero, hasta donde es de nuestro conocimiento, no existe un estudio de las dehidrinas, desde el punto de vista de los procesos de regulación de la expresión génica en plantas del

genero *Capsicum*. Particularmente, los chiles silvestres como el chile piquín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) tienen mucho potencial ya que mantienen la mayor diversidad genética y que a la vez una parte de ella fue transmitida a los chiles cultivados (Aguilar-Meléndez *et al.*, 2009).

El chile piquín

El chile piquín (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum* (Duna) Heiser & Pickersgill) es la variedad considerada como el progenitor silvestre de los chiles domesticados de la especie *C. annuum* (Eshbaugh, 1980). La amplia aceptación que tiene esta variedad se debe a las características de picor, sabor, aroma, color, etc. Sin embargo, su cultivo comercial es limitado, debido en gran parte a la dificultad para hacer germinar la semilla, la mayoría de chile piquín que se comercializa proviene de las colectas de plantas silvestres (Rodríguez, 2004).

Botánica del chile piquín

El chile silvestre es un arbusto silvestre, perenne, el fruto es una baya redonda u oblonga de 3 a 6 mm de diámetro que crece en posición eréctil. En estado inmaduro el fruto es de color verde oscuro, debido a la alta concentración de clorofila, sin embargo al madurar se torna de color rojo, causado por una alta concentración de licopersinas. Las plantas de chile piquín alcanzan la madurez reproductiva entre los 6 y 10 meses de edad. La floración en Arizona comienza durante los meses de mayo y dura hasta agosto y la fructificación es de junio a

octubre (Nabhan 1985; Nabhan *et al.*, 1990).

Dispersión y distribución geográfica

El color rojo de los frutos atrae a diversas aves, que al comerlos se encargan de dispersar las semillas (las aves carecen de sensores receptores de capsaicina). Las semillas al pasar por el tracto digestivo eliminan el efecto inhibitorio causado por diferentes compuestos químicos presentes en la semilla, así el chile piquín crece bajo árboles en sitios montañosos cercanos a márgenes de arroyos o cañones (Nabhan 1985, Nabhan *et al.*, 1990).

Esta solanacea se extiende al norte del Trópico de Cáncer y se distribuye ampliamente desde el sur de los Estados Unidos hasta el noroeste de Sudamérica; sus límites hacia el norte ocurren en los desiertos sonorenses y chihuahuenses, más allá de 50 km de la frontera entre México y los Estados Unidos, en Arizona, Nuevo México y Texas (Eshbaugh, 1993). En México se encuentra en toda la zona costera del país, desde Sonora a Chiapas por el Pacífico y de Tamaulipas a la Península de Yucatán, incluyendo Quintana Roo, por el Golfo de México en donde recibe muchos nombres locales (Galmarini, 1999; Medina *et al.*, 2009). Las poblaciones de chile piquín se localizan principalmente en altitudes menores a 1300 msnm, con una precipitación anual de más de 500 mm y una temperatura media anual de entre 21-24° C y con baja probabilidad de ocurrencia de heladas (Rodríguez *et al.*, 2004), aunque también se encuentra en condiciones de precipitación pluvial escasa, la cual oscila entre 100 y 200 mm de lluvia con una evapotranspiración media anual de

2000 mm y temperaturas de 34 a 40°C durante el verano y aun a fines de primavera (Murillo-Amador *et al.* 2001; Nieto-Garibay *et al.* 2009).

Las fluctuaciones de temperatura influyen en la regulación de la germinación de las semillas, sin embargo existen desde luego diferencias en el porcentaje y velocidad de germinación de acuerdo con las poblaciones o el sitio donde se encuentre (Hernández-Verdugo *et al.*, 2010).

El chile piquín en estado natural o silvestre se ha adaptado a toda esa gama de climas; esto quiere decir que esta solanacea prospera en condiciones de aridez, poca precipitación anual y heladas, condiciones de exceso de agua, resistencia a plagas y/o enfermedades (Tewksbury, *et al.*, 1999). Desde esta perspectiva, el conocimiento de la expresión y diversidad de los genes de dehidrinas del chile silvestre en relación a su capacidad de adaptación en diferentes ecosistemas, podría ser extrapolado a los chiles cultivados y su mejoramiento para resistir condiciones de estrés.

III. ARTICULO I

EXPRESIÓN DE 4 DEHIDRINAS EN CHILE PIQUÍN (*Capsicum annuum* var. *glabriusculum*) bajo condiciones de estrés hídrico

Enviado para su publicación a la revista ITEA

EXPRESIÓN DE 4 DEHIDRINAS EN CHILE PIQUÍN (*Capsicum annuum* var.
glabriusculum) BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO

EXPRESSION OF FOUR DEHYDRIN GENES IN “CHILE PIQUÍN” (*Capsicum*
annuum var. *glabriusculum*) UNDER WATER STRESS

De la cruz-Olivares, J^{1*}; E. M. Rodríguez²; Aguilar-Meléndez A.³; Robledo-Torres V.¹;
Ramírez-Meraz M.⁴

¹Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
Calzada Antonio Narro 1923, C. P. 25135, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

²Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
Calzada Antonio Narro 1923, C. P. 25315, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.

³Centro de Investigaciones Tropicales. CITRO. Ex-Hacienda Lucas Martín Privada de
Araucarias s/n Col. Periodistas, C. P. 91019, Xalapa, Veracruz, México.

⁴Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. INIFAP. Campo
Experimental Las Huastecas. Carretera Tampico-Mante, km 55. Villa Cuauhtémoc, C. P.
89610, Tamaulipas, México.

*josedcolivares@gmail.com

Resumen

Se compararon plantas de dos poblaciones de chile piquín, que crecen en condiciones de humedad contrastantes, en cuanto a su respuesta a condiciones de estrés hídrico en invernadero e *In vitro*. Los tratamientos consistieron en suspender el riego durante 16 días más un riego de recuperación y una evaluación final a 19 días. Las plantas control se regaron normalmente. Se midió la tensión de agua en el suelo, potencial hídrico en hojas antes del amanecer y el contenido relativo de agua en las hojas. Las condiciones de estrés hídrico *In vitro* solo consistieron en poner hojas de plantas de chile a desecar en cajas Petri. En ambos experimentos (en invernadero e *In vitro*) se hizo análisis de la expresión por RT-PCR. Los datos de potencial hídrico y contenido relativo de agua en las hojas indicaron que la población de Coahuila perdió menos agua respecto a la población de Veracruz. En el análisis de expresión de dehidrinas solo se observaron diferencias en el gen KS18 que si parece responder al gradiente de la pérdida de agua en condiciones de desecación de plantas de chile piquín. Los condiciones en las que se realizó el ensayo de sequía en plantas de chile y de acuerdo a los parámetros fisiológicos medidos determinan que el estrés hídrico impuesto fue severo, sin embargo las plantas recurren a otros mecanismos diferentes al de expresión de dehidrinas analizadas.

Palabras Clave: Proteínas LEA, sequía, transcritos.

Abstract

In this study two populations of “chile piquin” were compared to test the response to water stress in greenhouse and *In vitro*. The treatments consisted in stop watering during 16 days plus a three-day recovery period after watering. The control plants were

irrigated every day. Parameters measured were water tension within the soil, leaf water potential before sunrise and leaf relative water content. The *In vitro* water stress was imposed by simply let to dehydrate chile leaves in Petri dishes. The Capsicum *Dhn1*, *Dhn13*, *Tas14* and *KS18* gene expression was analyzed by RT-PCR in both experiments. The data of water stress and relative water content in leaves indicated that the population of Coahuila lost less water in relation to the population of Veracruz. Within the analysis of dehydrin expression, only *KS18* seems to be a water stress responsive gene under the conditions studied. The water stress accomplished was severe according the conditions imposed and the physiological parameters measured; therefore, we conclude that chile piquin plants utilize different mechanisms to cope with water stress than those in which the dehydrins analyzed in this paper are involved.

Index words: LEA proteins, drought, transcripts

Introducción

La importancia del estudio de las DHNs es que típicamente se acumulan cuando existe un déficit en el contenido de agua de las células (Close, 1997; Eriksson y Harrison 2011). Éstas se acumulan en grandes cantidades en los embriones de las plantas durante las etapas finales del desarrollo de la semilla cuando empieza a perder humedad. Las dehidrinas se acumulan también en diferentes tejidos vegetativos en respuesta a déficit hídrico, baja temperatura, sequía, salinidad o aplicación de ácido abscísico por lo que se

les asocia con un papel de protección o estabilizador de membranas y de ciertas proteínas (Close, 1996; Campbell y Close, 1997; Close, 1997).

Se ha documentado ampliamente una correlación positiva entre las dehidrinas y la adaptación a la deshidratación celular en plantas. Los genes de dehidrinas pueden estar involucrados, entre muchos otros, en la adaptación de las poblaciones a ambientes extremos, y explicar parte de la variabilidad genética de las poblaciones en cuanto a respuesta a condiciones de sequía y otros estreses.

Las dehidrinas son parte de un grupo extenso de proteínas conocidas como LEA (Late Embryogenesis Abundant), las cuales se caracterizan por ser altamente hidrofílicas, por permanecer en solución a temperaturas de ebullición y tener poca o nula estructura secundaria. Las dehidrinas en particular, se distinguen por poseer una región conservada de 15 aminoácidos rico en lisinas, conocido como segmento K. También poseen una serie continua de residuos de serina, el segmento S y algunas tienen también un segmento consenso llamado segmento Y. La presencia y número de cada uno de estos segmentos permite agrupar a las diferentes dehidrinas (Campbell y Close, 1997): el número y el orden de segmentos Y-, S- y K- define diferentes DHNs en subclases: Y_nSK_n , Y_nK_n , SK_n , K_n y K_nS (Campbell y Close, 1997; Svensson *et al.*, 2002).

Pelah *et al.* (1997) observaron una relación positiva entre la acumulación de dehidrinas y la tolerancia a la sequía en el álamo (*Populus tremula*). Algo similar encontraron Tabaei-Aghdaei *et al.* (2000) al comparar la acumulación de dehidrina en los tejidos de dos especies de pastos, *Agropyron desertorum* tolerante a sequía contra *Lophopyrum elongatum* que tolera en menor proporción la sequía. Los autores observaron diferentes niveles de tolerancia bajo estrés por, los investigadores detectaron niveles mucho más

altos de polipéptidos de dehidrina en *Agropyron desertorum* tolerante a la sequía que en *Lophopyrum elongatum*.

Investigaciones realizadas por Cellier *et al.* (1998) de una variedad de girasol (*Helianthus annuus*) tolerante a la sequía en comparación con una variedad sensible. Observaron altos niveles de transcritos de genes de dehidrinas HaDhn1 y HaDhn2 en la variedad tolerante a sequía. La acumulación de transcritos de HaDhn1 y HaDhn2 se correlacionan con el potencial hídrico en la hoja de la planta cuando se comparan los cultivares bajo el mismo contenido gravimétrico de agua del suelo. Godoy *et al.* (1990) sometieron a plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum* var. Rutgers) a estrés salino y aplicación de ABA por 24 h, con el análisis por Southern blot encontraron que en hojas de tomate el mRNA de la dehidrina Tas-14 incrementa sustancialmente con el tratamiento de estrés salino que con la aplicación de ABA. Chung *et al.* (2003) analizaron la expresión del gen Dhn-1 en un experimento con diferentes hojas de chile de una variedad coreana a las que sometieron a tratamiento *In vitro* de estrés hídrico, los autores encontraron la presencia de transcritos fue evidente desde las 2 h de impuesto el estrés hídrico y la expresión aumentó gradualmente a las 4 h, a las 8 h alcanzó niveles muy altos y a las 24 h el nivel de expresión disminuyó. Actualmente, existen pocos estudios de las dehidrinas en plantas del género *Capsicum*. Los chiles silvestres como el chile piquín (*Capsicum annuum* var. glabriusculum) teóricamente tienen la mayor diversidad genética de la cual una parte fue transmitida a los chiles domesticados y que hoy en día son cultivados en todo el mundo (Aguilar-Meléndez *et al.*, 2009). Los chiles cultivados de *C. annuum* son los chiles económicamente más importantes y sus parientes silvestres (*Capsicum annuum* var. glabriusculum) se distribuyen en todo México a

menos de 1500 msnm (Pickersgill, 1971). Es importante entender la función de los genes de dehidrinas que pudieran estar relacionados a funciones de adaptación de la planta para sobrevivir a condiciones abióticas cambiantes como la sequía. Si logramos entender el papel de las dehidrinas en las plantas de chile silvestre entonces podríamos en el futuro para tomar decisiones educadas para la conservación de estas poblaciones en su ambiente natural o realizar fitomejoramiento de los chiles cultivados de la especie *Capsicum annuum*. En este trabajo se hizo un análisis comparativo en la expresión de dehidrinas y respuesta fisiológica en plantas de dos poblaciones distantes geográficamente y contrastantes en cuanto a condiciones climatológicas. El objetivo fue evaluar la respuesta fisiológica y la expresión de 4 dehidrinas en chile piquín sometido a diferentes condiciones de estrés hídrico.

Material y métodos

Material vegetal

Semillas de chile silvestre fueron colectadas de una población en el estado de Veracruz (18° 45' 58.56" N, 96° 48' 20.40" O, altitud 446 msnm). La semilla de una población del estado de Coahuila (27° 53' 01" N, 101° 29' 29" O, altitud 440 msnm) fue proporcionada por el Dr. Horacio Villalón Mendoza de la Universidad Autónoma de Nuevo León. La distancia lineal entre una población y otra es de 1,110 km.

Experimento de sequía en invernadero

Las semillas de ambas procedencias se sometieron a un tratamiento de osmo-acondicionamiento con nitrato de potasio (Marín *et al.*, 2007). Posteriormente las

semillas se sembraron en charolas de poliestireno con un sustrato consistente en una mezcla de peat moss, vermiculita y agrolita, (2:2:1). Después de 20 días las plántulas se trasplantaron a macetas de 20 kg con suelo de bosque de pino. La nutrición del cultivo se realizó con una solución universal de Steiner (1961), ajustada a las condiciones del sustrato en las macetas y de agua de riego cada semana. Las macetas se mantuvieron elevadas del suelo, para mejorar el drenaje. Las plantas de cada procedencia se distribuyeron en dos bloques, dentro de cada uno, las plantas sometidas al tratamiento de sequía y las controles se distribuyeron al azar. El tratamiento de sequía consistió en suspender el riego 3 meses después del trasplante, las plantas se dejaron de regar por 15 días, tiempo en el cual las plantas mostraron síntomas de marchitamiento. En este tiempo se regaron de nuevo para observar la recuperación. Las plantas control se regaron normalmente.

Parámetros para cuantificar el estrés hídrico

En las macetas se instalaron sensores de humedad del suelo Watermarck® 200ss para el monitoreo de la pérdida de agua en el suelo de las macetas de ambas procedencias, tanto tratadas como las plantas control. Las mediciones de la tensión de humedad en el suelo se realizaron cada dos días. Las muestras de tejido y las determinaciones de potencial hídrico y contenido relativo de agua en las hojas se realizaron a los 0, 5, 9, 12, 16 y 19 días.

La medición de potencial hídrico se hizo antes del amanecer (Ψ_{aa}) entre 4 y 5 de la mañana con una cámara de presión tipo Schollander, de acuerdo a la metodología recomendada por Day y Walsh (1980), esto se hizo en tres plantas diferentes.

Para cuantificar el contenido relativo de agua en las hojas, se tomaron muestras de 1 g de tejido en la misma planta en donde se obtuvo el potencial hídrico. Las hojas se colocaron en tubos Falcon de 50 ml que previamente se llenaron con agua destilada y se dejaron en refrigeración a 4°C por toda la noche. Al siguiente día a las hojas se secaron superficialmente con papel absorbente y se midió el peso turgente. Posteriormente se secaron en una estufa, a una temperatura de 60°C por 48 h y se registró el peso seco. El contenido relativo de agua en las hojas (CRA) se obtuvo de acuerdo a la fórmula descrita por Teulat *et al.* (1997). Las muestras de hojas para extracción de ARN se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservaron a -80°C hasta su análisis.

Experimento de deshidratación in vitro

Se utilizaron hojas de plantas adultas y en etapa de producción de chile piquín de ambas poblaciones (Veracruz y Coahuila), las hojas se colocaron en cajas petri con algodón. Los tratamientos consistieron en que el algodón se humedeció y las hojas se colocaron de tal manera que el peciolo tuviera contacto directo con el algodón húmedo, esto fue para las muestras control y el algodón se dejó seco para las muestras tratadas. y se dejaron en un estante con luz artificial. Los muestreos se hicieron a las 2, 4 y 8 h, en cada tiempo de muestreo se tomaron hojas y se pusieron de inmediato en nitrógeno líquido. Como control absoluto se tomaron muestras frescas directo de la planta (0 h).

Análisis de la expresión por RT-PCR

La extracción de ARN se realizó a partir de 80 mg de tejido de hoja, que se pulverizaron en un mortero en presencia de nitrógeno líquido. Se siguió el método de cloruro de

guanidinio, fenol y cloroformo de Chomczynski y Sacchi (1987), utilizando el reactivo Trizol® de Molecular Research Center, Inc., siguiendo el protocolo del fabricante. La cantidad y calidad de ARN fue analizada en una electroforesis en gel desnaturizante de agarosa al 1.3% , el ARN se tiñó con bromuro de etidio contenido en el buffer de carga (Sambrook y Russell, 2001).

Posteriormente el ARN se trato con deoxiribonucleasa de la marca Sigma, esto con el fin de purificar las muestras. El ARN total se utilizó como molde para la síntesis de cADN a una concentración de 400 ng/μl, utilizando un kit TaqMan RT-PCR (Applied Biosystems) y utilizando hexámeros generados al azar como oligonucleótidos iniciadores. Con la misma muestra de cADN se realizaron las amplificaciones de los fragmentos de cada uno de los genes de interés. Los oligonucleótidos cebadores se diseñaron usando Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000). La secuencia de los oligonucleótidos utilizados se presenta en la Tabla 1.

Las reacciones de PCR se hicieron en un volumen total de 25 μl, que contenía 1 μl de cADN, 10 mM Tris/HCl, pH 9, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM de cada dNTP, 0.3 μM de cada uno de los oligonucleótidos cebadores y 0.5 U de polimerasa. Todas las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador Multigene 60 (Labnet InteARNtional), bajo las siguientes condiciones: una desnaturalización inicial a 94 °C por 10 min, seguido por 28 ciclos de 30 s a 94° C, 60 s a 56° C, 90 s a 72° C, y una incubación final de 10 min a 72° C. Los productos de PCR fueron analizados utilizando 5 μl en una electroforesis en geles de agarosa al 2 % en TAE 1X. Los amplicones se tiñeron con colorante RedGel marca Biotium Sigma, contenido en el buffer de carga. Finalmente los fragmentos fueron visualizados en un transiluminador UV.

Resultados

En la figura 1 aparece el curso temporal de la pérdida de agua en macetas, las plantas de la población de Veracruz alcanzaron -150 KPa y las plantas de la población de Coahuila una tensión de agua en el suelo de -127 KPa. Posteriormente al riego de recuperación después de 3 días, las plantas de ambas poblaciones recuperaron su estatus hídrico similar a las de las plantas control. Se realizaron mediciones de potencial hídrico antes del amanecer (Ψ_{aa}) esto es cuando el potencial hídrico en la planta tiende a estar en equilibrio con el potencial hídrico en el suelo. En la figura 2 aparece la tendencia del potencial hídrico durante el ciclo de sequía. En efecto al inicio del ciclo (T_0) tanto plantas control como tratadas registraron un potencial hídrico cercano a cero, es de esperarse puesto que las plantas fueron regadas a capacidad de campo y posteriormente se suspendió el riego, además de que el invernadero donde se llevó a cabo el ensayo de sequía registro en promedio una temperatura de 28° C durante el día y 24° C en la noche, y la humedad relativa se mantuvo entre 70 y 80%.

En la medida que transcurren los días el potencial hídrico se hace más negativo cayendo drásticamente en el T_3 , las plantas de ambas poblaciones manifiestan un estrés hídrico de -2.5 MPa, sin embargo en el T_4 se observa que las plantas de la población de Veracruz experimentan un estrés hídrico más severo cayendo su potencial hídrico hasta -3.3 MPa. Por otra parte las plantas de la población de Coahuila el potencial hídrico no bajo tanto respecto a la población de Veracruz.

Al final del ciclo en la fase de recuperación, en la figura 2 se aprecia notablemente que las plantas de chile piquín de ambas poblaciones tuvieron la versatilidad de responder al

riego de emergencia y tomar el agua del suelo necesaria para revertir el déficit hídrico producto del estrés impuesto.

Contenido relativo de agua en las hojas

El contenido relativo de agua en las hojas en conjunto con el potencial hídrico puede determinar si existe mecanismo de ajuste desde el punto de vista bioquímico, tales como el ajuste osmótico. La figura 3 muestra el gradiente de la pérdida de agua en hojas de chile piquín en el tiempo T4 evidentemente existió diferencia entre poblaciones, Veracruz registro 47% y Coahuila 60%. El contenido relativo de agua en las hojas registrado por la población de Veracruz parece ser demasiado fuerte visualmente las plantas mostraron pérdida de la turgencia celular (hojas flácidas). Sin embargo con el riego de recuperación las plantas de ambas poblaciones responden al riego y recuperan su estatus de agua similar al estado de capacidad de campo.

Expresión de las dehidrinas bajo condiciones de sequía en invernadero

En la figura 4 primeramente se observa en general una expresión homogénea del gen ARN-18s lo cual indica que la expresión menor o mayor de los demás genes es atribuida directamente a los tratamiento impuesto.

De acuerdo con el análisis RT-PCR Dhn-1 y Dhn-13 en las plantas de la población de Veracruz y Coahuila parecen presentar una expresión basal independiente del estrés hídrico, puesto que en condiciones de riego (entre 93 y 90% de contenido relativo de agua en las hojas) la presencia de transcritos en general es constante, y en condiciones de estrés hídrico no hay expresión o diferencia de Dhn-1 y Dhn-13 con respecto a las

plantas control, a pesar del gradiente en el contenido relativo de agua en las hojas. Parece contrario el efecto del estrés hídrico, es decir la expresión puede ser dependiente del riego pues a grandes rasgos se notan transcritos en las plantas bien regadas y las que no se riegan no hay expresión, solo aparecen transcritos en el riego de recuperación.

Los transcritos expresados de KS18 parecen no tener una respuesta clara con el estrés hídrico en plantas de la población de Veracruz y Coahuila, ya que hay expresión basal de gen con fluctuaciones.

En la dehidrina Tas-14 no hubo presencia de transcritos en las plantas control ni en las tratadas tampoco en las dos poblaciones analizadas.

Expresión de las dehidrinas en condiciones de desecación In vitro

El análisis por RT-PCR de la expresión de 4 Dhns con respecto a un gen constitutivo (ARN-18s) se muestra en la figura 5. Dhn-1 y Dhn-13 no mostraron diferencias en la expresión entre procedencias ni entre tratamientos. Las condiciones de estrés hídrico *In vitro* impuesto en este experimento no impactaron en el aumento o disminución de transcritos, por el contrario estos genes muestran claramente que son constitutivos de estas plantas, puesto que incluso en las cero horas aparece el fragmento típico de ambas dehidrinas.

La dehidrina KS18 (fig. 5) muestra un claro aumento en la expresión de transcritos de este gen. En el caso de las muestras control a las 0 horas no hay expresión ni en los tiempos posteriores, sin embargo en el tejido sometido a estrés hídrico muestra evidentemente muestra un aumento en la expresión. Por una parte las hojas de plantas de la población de Coahuila muestran un rápido aumento en la expresión desde las 2 horas y aumenta aún más en las 4 horas y al cabo de las 8 la presencia de transcritos parece

disminuir.

Las hojas de plantas de la población de Veracruz parecen responder con aumento en la expresión de KS18 hasta las 8 horas de impuesto el estrés hídrico.

En este caso Tas-14 no mostró una clara expresión que permite distinguir entre hojas control y tratadas, sin embargo en hojas de la población de Veracruz hay una aparente expresión a las 4 h, en las hojas de la población de Coahuila no hay expresión. Aunque a las cero horas aparece una aparente expresión basal que con el paso de las horas desaparece.

Discusión

El potencial hídrico mostró diferencias en su curso temporal en las dos poblaciones, pudo observarse que las plantas de la población de Veracruz mostraron mayor marchitamiento que posteriormente se revirtió con el riego de recuperación. En contraste, las plantas de la población de Coahuila no se notaron marchitas. Las diferencias mostradas por las poblaciones, tanto en potencial hídrico, como en contenido relativo de agua, pudieran explicarse por el hecho de que la población de Coahuila tenía menos follaje y pudo perder menos agua por evapotranspiración. Algunas investigaciones como la de Kulkarni y Phalke (2009) en el que evaluaron el efecto del estrés hídrico en este caso en un sistema de riego por goteo, completamente regadas (6 L) y medianamente regadas (3 L) por dos semanas, los autores encontraron diferencias significativas en el tamaño de la raíz, y el rendimiento de varios cultivares de chile picante (*Capsicum annuum* L.). También encontraron que a un potencial hídrico de -0.42 MPa las plantas aumentaron el crecimiento de raíces primarias, secundarias y raíces

laterales superficiales. De esta manera pueden aumentar la capacidad de absorción de agua en la superficie del suelo bajo condiciones de sequía. El potencial hídrico obtenido en nuestro experimento abre la posibilidad de que en plantas de la población de Coahuila haya un temprano cierre estomático (a los 12 días de impuesto el tratamiento) con respecto a las plantas de Veracruz. Delfine *et al.* (1999) compararon la fotosíntesis entre plantas de chile irrigadas y de temporal, los autores encontraron una menor conductancia estomática en las plantas de temporal y esto afectó también la producción.

El estrés hídrico impuesto a plantas de chile en este experimento provocó que el contenido relativo de agua en hojas bajara hasta 47% en la población de Veracruz y hasta 60% en la población de Coahuila. Las diferencias obtenidas de CRA entre poblaciones exhiben los mecanismos fisiológicos de adaptación que en forma natural recurren las plantas para sobrevivir a las condiciones ambientales adversas. Cabe resaltar que las condiciones ambientales de la localidad donde se colectó la población de Veracruz presenta un clima cálido húmedo con lluvias en verano, la precipitación total anual es de 2,830 mm, la temperatura media anual es de 24°C (Castillo *et al.*, 2003). Las condiciones ambientales de la localidad de la población de Coahuila es un clima seco semicálido, la temperatura media anual es de 20.6° C y la precipitación media anual de 592 mm (SMN, 2013). En esta investigación en base a los datos de Ψ_{aa} y CRA se puede suponer que las plantas no mostraron ajuste osmótico en las hojas. Sin embargo, parece que en la población de Coahuila hubo un cierre estomático oportuno para perder menos agua, con respecto a la población de Veracruz. En investigaciones como Del Amor *et al* (2010) donde evaluaron el efecto de la aplicación de antitranspirante (pinoleno) en la fotosíntesis y sus relaciones hídricas bajo diferentes niveles de CO₂ y estrés hídrico en

plantas de pimiento. Los autores encontraron que en plantas de pimiento sometidos a estrés hídrico severo ($CRA \leq 60\%$) el contenido de prolina en hojas aumenta significativamente de 2.4 a 120.6 mmol kg⁻¹ en masa seca.

A pesar del severo estrés hídrico impuesto en el experimento de sequía, la *Dhn-1* parece no haber una respuesta clara, esto puede deberse a que en plantas completas puede haber otros mecanismos de respuesta para tolerar el estrés hídrico. Por otra parte el estrés en condiciones de laboratorio presentado en este trabajo de desecación *In vitro* tampoco hubo cambios en los genes de *Dhn-1* y *Dhn-13*, estos resultados no concuerdan con los encontrados por Chung *et al.* (2003) donde los autores sometieron a estrés hídrico *In vitro* hojas cortadas de plantas de chile de la variedad Bukang, dejaron que se deshidrataran en una mesa de trabajo y analizaron la expresión de *Dhn-1* por diferentes tiempos hasta alcanzar las 24 h. Los autores encontraron que la mayor presencia de transcritos fue a las 2 h y alcanzó la mayor acumulación a las 4 y 8 h y finalmente a las 24 h la presencia de transcritos desapareció. Los autores impusieron condiciones de estrés hídrico severo, sin embargo en nuestro experimento de estrés hídrico *In vitro*, que es similar no encontramos diferencia en la expresión de *Dhn-1*, cabe resaltar que los autores no consideraron un tiempo cero, como control absoluto que en dado caso pudiera descartar la expresión producto de la herida al escindir la hoja y no por tratamiento impuesto.

En el caso de *Dhn-13*, Tommasini *et al* (2008) en un estudio del transcriptoma de plantas de cebada sometidas tanto a sequía como a heladas, encontraron que esta dehidrina del subgrupo KS fue inducida en el ensayo de ciclos de congelamiento, pero mostró muy poca inducción en el ensayo de sequía. Rodríguez *et al.* (2005) en un

estudio de caracterización de la Dhn-13 en cebada encontraron una expresión basal en condiciones normales y un aumento al someter las plantas a condiciones de frío, por lo que a esta dehidrina se le atribuye un papel en la aclimatación al frío.

Por otra parte en nuestro experimento de sequía la dehidrina Tas-14 no respondió a las condiciones impuestas. Sin embargo según el experimento de estrés hídrico *In vitro* en el tiempo cero apareció una expresión basal y posteriormente desaparecen los transcritos. La presencia de transcritos en el tiempo cero puede ser atribuida a la herida causada por corte de la hoja, ya que posteriormente desaparece y en el caso de las hojas de la población de Veracruz aparece una clara expresión a las 4 h, en las hojas de la población de Coahuila no hubo expresión. La expresión de Tas-14 bajo condiciones de estrés hídrico no es muy clara en nuestra investigación ya que en otras investigaciones se ha encontrado un aumento significativo de transcritos en respuesta a tratamientos de manitol, NaCl (Godoy *et al.*, 1990; Godoy *et al.*, 1994) y ABA en plantas transgénicas de Tabaco (gen exógeno GUS) y que a la vez es diferencial la expresión en mayor o menor grado en órganos como anteras, pétalos, sépalos y pistilos (Parra *et al.*, 1996).

La dehidrina KS18 que en nuestro experimento parece mostrar respuesta al gradiente de la pérdida de agua en el experimento de desecación *In vitro* cabe resaltar que los primers de Ks-18 fueron diseñados a partir de EST de Dhn-1 de papa silvestre (*Solanum commersonii*). Baudo *et al.* (1996) *S. commersonii* lo reportan como una especie resistente a heladas en comparación con especies cultivadas, los autores estudiaron la expresión del gen Dhn-1 bajo tratamientos de ABA y baja temperatura, su análisis reveló que en efecto la inducción del gen fue relativamente rápida y en grandes cantidades de los transcritos después de un día para el tratamiento de baja temperatura y a las 7 h para

el tratamiento de ABA.

Referencias Bibliográficas

- Aguilar-Melendez A, Morell P, Roose M, Kim S (2009). Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico. *American Journal of Botany* 96: 1190-1202.
- Baudo M, Meza-Zepeda L, Palva T, Heino P (1996). Induction of homologous low temperature and ABA-responsive genes in frost resistant (*Solanum commersonii*) and frost-sensitive (*Solanum tuberosum* cv. Bintje) potato species. *Plant Molecular Biology*. 30: 331-336.
- Campbell SA, Close T (1997) Dehydrins: genes, proteins and associations with phenotypic traits. *New Phytol.* 137: 61-74.
- Castillo G, Robles R, Medina M (2003). Flora y vegetación de la sierra Cruz Tetela, Veracruz, México. *Polibotánica*. 15:41-87.
- Cellier F, Conéjéro G, Breitler J, Casse F (1998). Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. *Plant Physiology*. 116:319–328.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical*

Biochemistry 162: 156-159.

- Chung E, Kim S, Yi S, Choi D (2003). *Capsicum annuum* Dehydrin, An Osmotic-Stress Gene In Hot Pepper Plants. *Molecules and Cells*. 15:327-32.
- Close TJ (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum*. 97:795-803.
- Close TJ (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiologia Plantarum*. 100: 291-296.
- Day RJ, Walsh SJ (1980) A manual for using the pressure chamber in nurseries and plantations. *Silviculture Report 1980-2*. Lakehead University School of Forestry. Thunder Bay, Ontario. Canada.
- Del Amor F, Cuadra-Crespo P, Walker D, Cámara J, Madrid R (2010). Effect of foliar application of antitranspirant on photosynthesis and water relations of pepper plants under different levels of CO₂ and water stress. *Journal of Plant Physiology*. 167: 1232-1238.
- Delfino S, Alvino A, Loreto F, Centritto M, Santarelli G (1999). Effects of water stress on the yield and photosynthesis of field-grown sweet pepper (*Capsicum annuum* L.). III International Symposium on Irrigation of Horticultural Crops 537: 223–229.

- Eriksson SK Y P. Harryson. 2011. Dehydrins: Molecular Biology, Structure and Function. In U Lüttge, E Beck, D Bartels (eds). Plant Desiccation Tolerance. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 289-305.
- Godoy J, Lunar R, Torres-Schumann S, Moreno J, Rodrigo R, Pintor-Toro J (1994). Expression, tissue distribution and subcellular localization of dehydrin TAS14 in salt-stressed tomato plants. *Plant Molecular Biology*. 26: 1921-1934.
- Godoy J, Pardo J, Pintor-Toro J (1990). A tomato cADN inducible by salt stress and abscisic acid: nucleotide sequence and expression pattern. *Plant Molecular Biology*. 15: 695-705.
- Kulkarni M and Phalke S (2009). Evaluating variability of root size system and its constitutive traits in hot pepper (*Capsicum annum L.*) under water stress. *Scientia Horticulturae*. 120: 159-166.
- Marín J, Mejía J, Hernández A, Peña A, Carballo A (2007). Acondicionamiento osmótico de semillas de tomate de cáscara. *Agric. Téc. Méx.* 33:3, 115-122.
- Parra M, Pozo O, Luna R, Godoy J, Pintor-Toro J (1996). Structure of the dehydrin *tas14* gene of tomato and its developmental and environmental regulation in

- transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* 32: 453-460.
- Pickersgill B (1971). Relationships Between Weedy and Cultivated Forms in Some Species of Chili Peppers (Genus *Capsicum*). *Evolution*, 25, 683-691.
- Rodríguez E, Svensson J, Malatrasi M, Choi D, Close T (2005). Barley Dhn13 encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression. *Theor Appl Genet* 110: 852-858.
- Rozen S, Skaletsky H (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, pp. 365-386. In: *Bioinformatics Methods and Protocols*. Krawetz S, Misener S (eds) Humana Press, Totowa, NJ.
- Sambrook J and Russell D (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- SMN. 2013. Normales Climatológicas por Estación, Coahuila, 00005020 Múzquiz (DGE). Servicio Meteorológico Nacional, México. Disponible en: http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=42&Itemid=75 (30 de noviembre de 2013).

- Steiner AA (1961) A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desiered composition. *Plant and Soil*. 15: 134-154.

- Svensson J, Ismail AM, Palva ET, Close TJ (2002) Dehydrins. In: Storey KB, Storey JM (eds) *Sensing, signaling and cell adaptation*. Elsevier, Amsterdam, pp 155-171.

- Tabaei-Aghdaei, S. R., Harrison, P., & Pearce, R. S. (2000). Expression of dehydration-stress-related genes in the crowns of wheatgrass species [*Lophopyrum elongatum* (Host) A. Love and *Agropyron desertorum* (Fisch. ex Link.) Schult.] having contrasting acclimation to salt, cold and drought. *Plant, Cell & Environment*, 23(6), 561-571.

- Teulat BB, Monneveux P, Wery J, Borries C, Souyrus I, Charrier A, This D (1997) Relationships between relative water content and growth parameters under water stress in barley: a QTL study. *New Phytologist*. 136: 99-107.

- Tommasini L, Svensson J, Rodríguez E, Wahid A, Malatrasi M, Kato K, Wanamaker S, Resnik J, Close T (2008). Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of Barley (*Hordeum vulgare* L.) *Functional & Integrative Genomics*. 8: 387-405.

Tabla 1. Oligonucleótidos cebadores utilizados. En cada par, la secuencia superior corresponde al directo, la inferior al complementario. La clave en la secuencia base corresponde a la del Genbank.

Nombre	Secuencia base	Secuencia de los oligonucleótidos, 5'-3'	Tamaño del amplicón en pares de bases
Dhn13	AY829646	GACACAAGGAAGGAGACAA CACTGCTACTGCTACTATCA	258
Dhn1	AY225438	CGGAAGACACTTCAGTTCCA CCGTCTTCTTCTGTCCTCCA	108
KS18	KS18031E10	CAAGACACAGCAAGGACGAA TGGCCACCACTAGAAATTGA	120
Tas14	KS050146T0	AGGTACTGGCACTGGAATGG TATACACCATGGCGTGAGCA	497
RNA18S	AB434922	AAGTCTGGTGCCAGCAGCCG GGAGCGCATCGCCGACAGAA	155

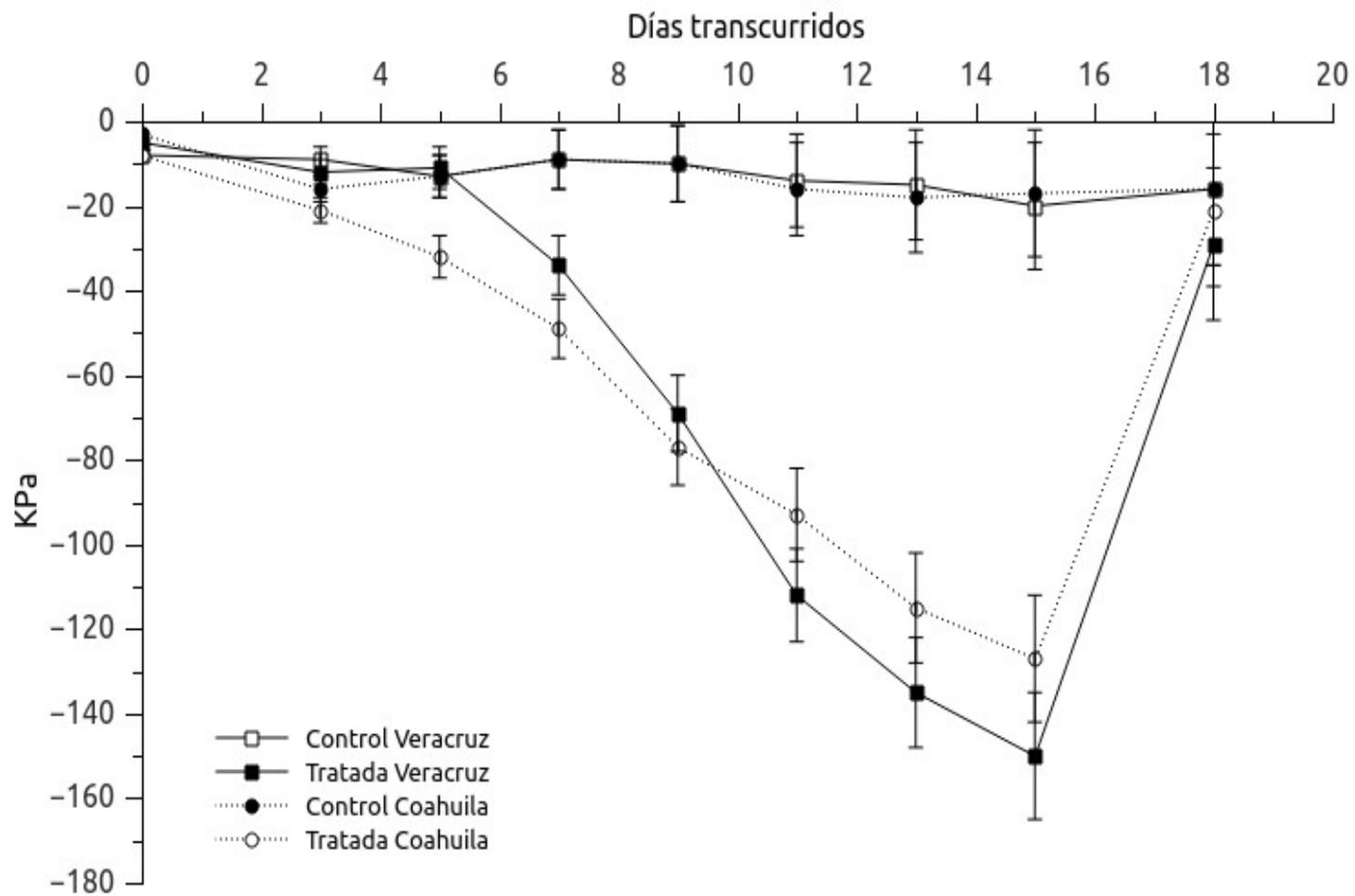


Figura 1. Gradiente de la pérdida de agua en suelo de plantas de chile piquín de población de Veracruz y Coahuila.

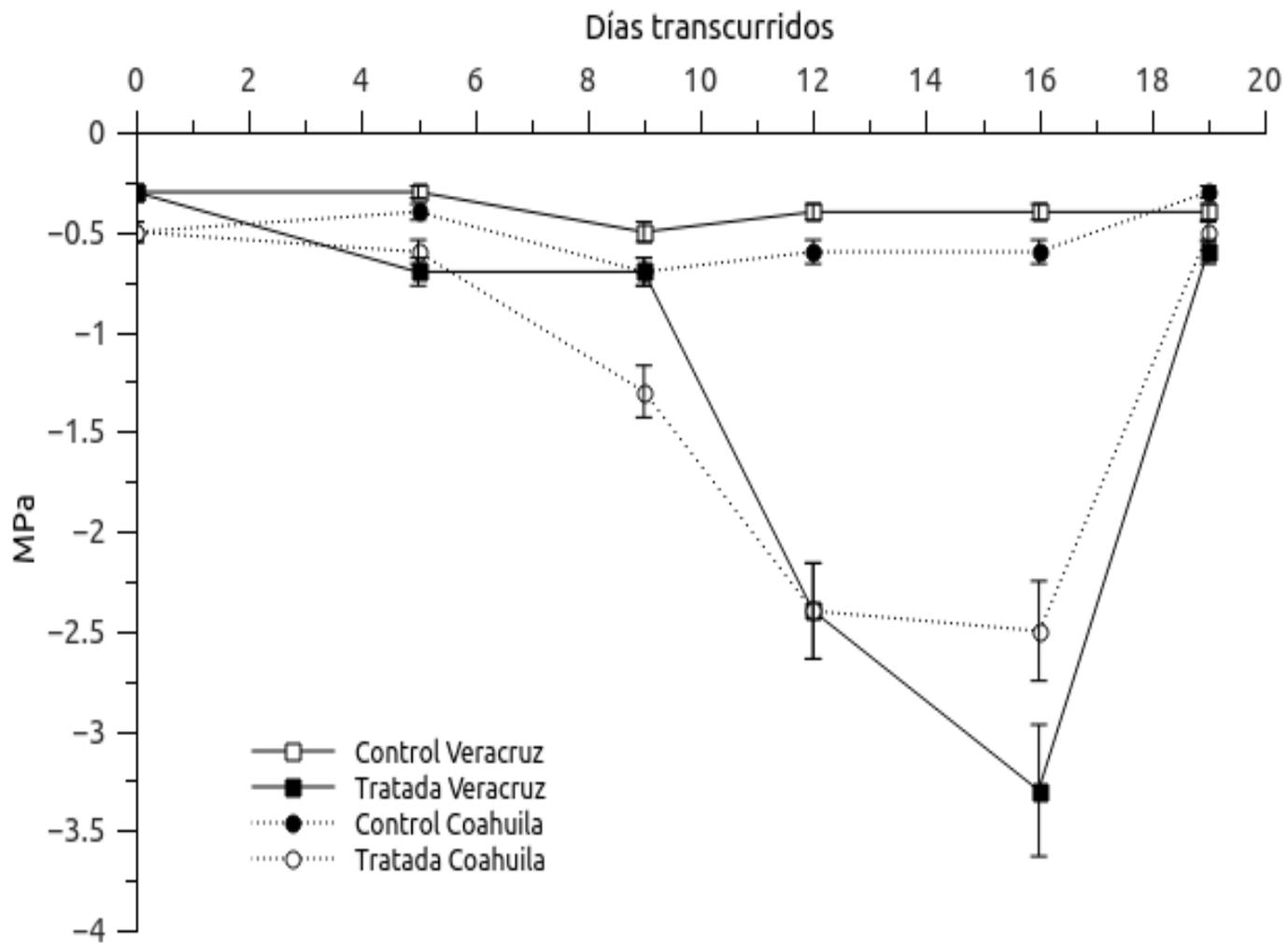


Figura 2. Potencial hídrico antes del amanecer en plantas de chile piquín de la población de Veracruz y Coahuila.

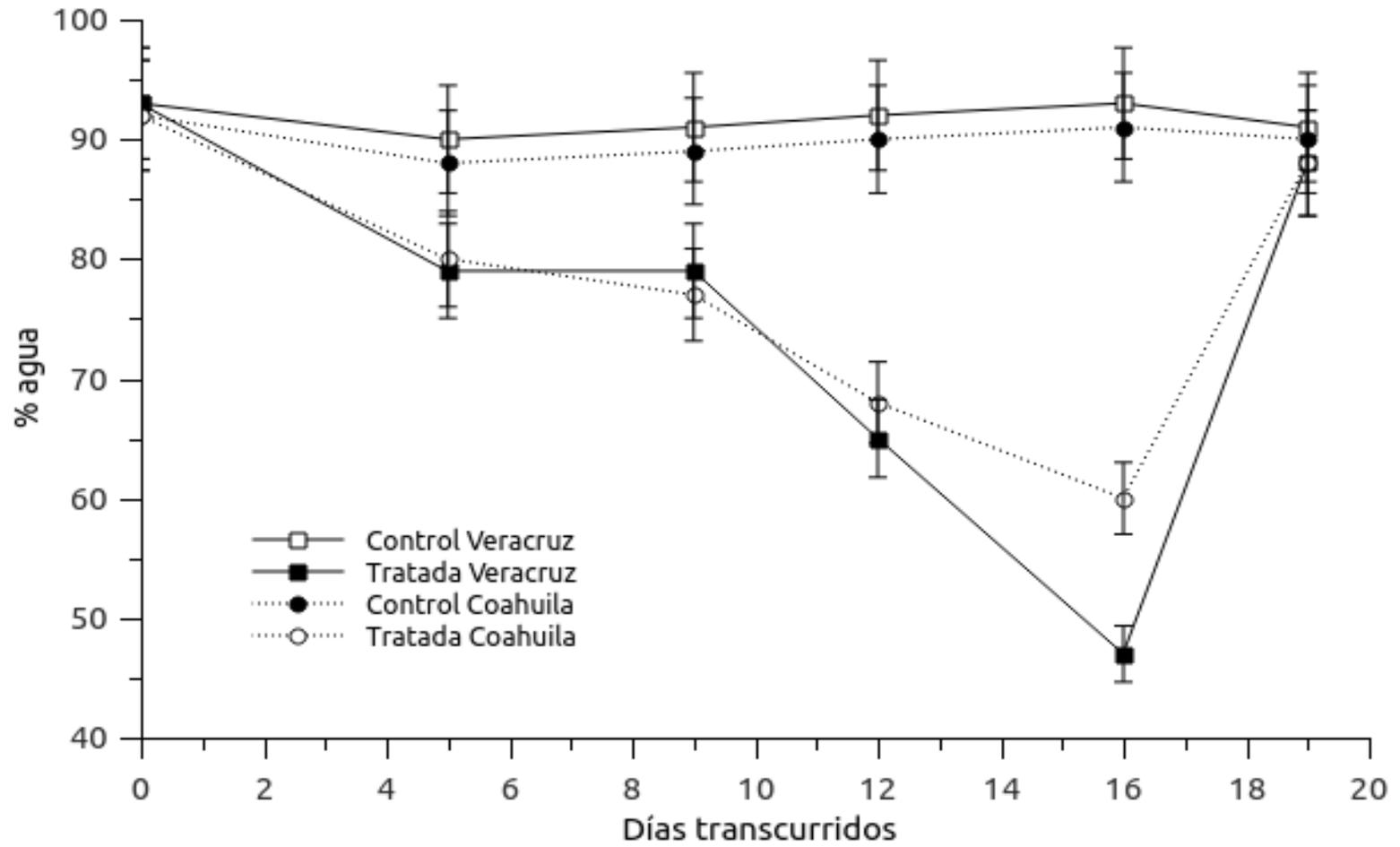


Figura 3. Contenido relativo de agua en las hojas en plantas de chile piquín de la población de Veracruz y Coahuila.

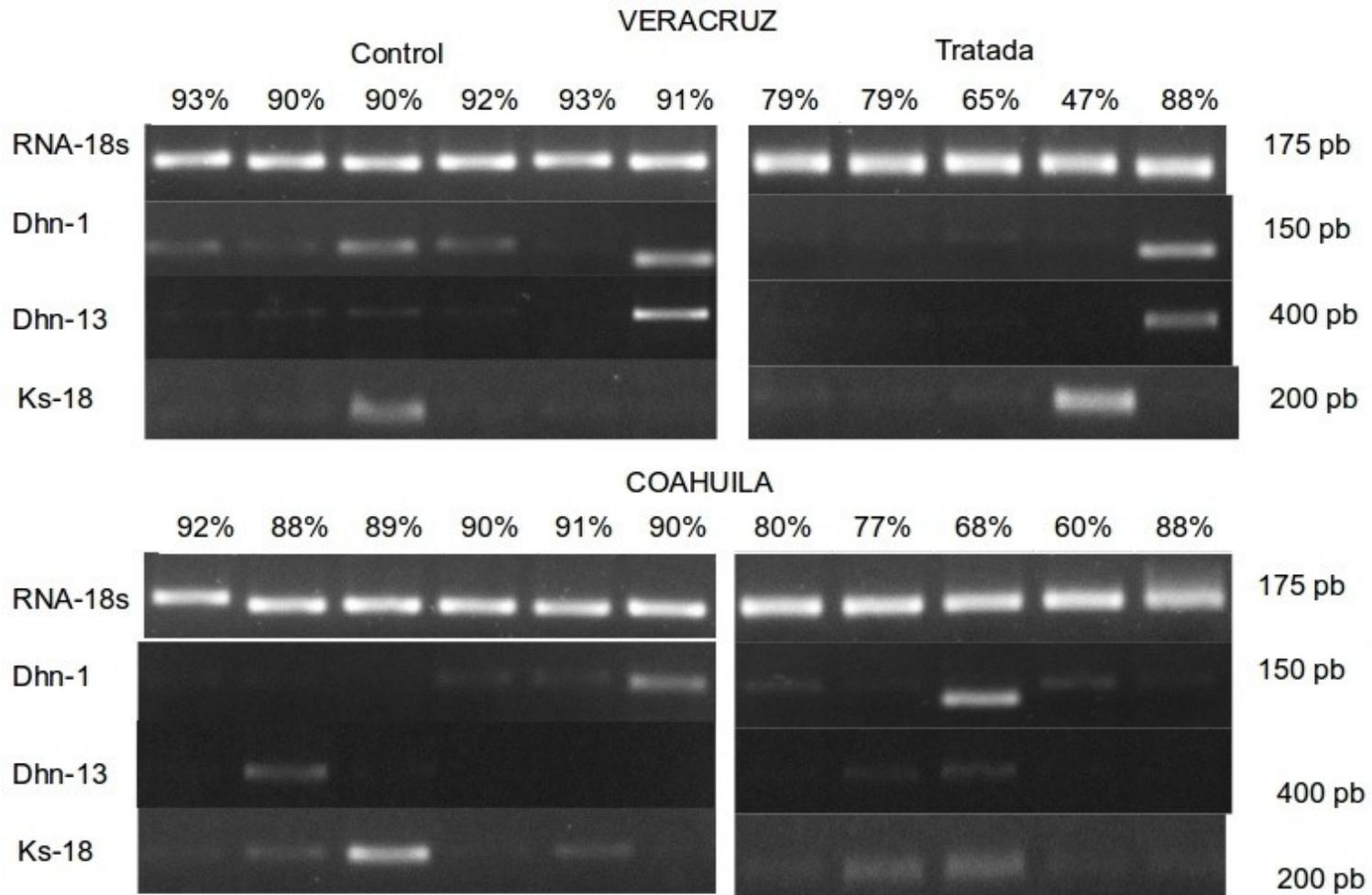


Figura 4. Expresión de *Dhns* por RT-PCR en plantas de chile piquín de la población de Veracruz y Coahuila bajo condiciones de sequía en invernadero. Los porcentajes representan el contenido relativo de agua en las hojas de las plantas (CRA).

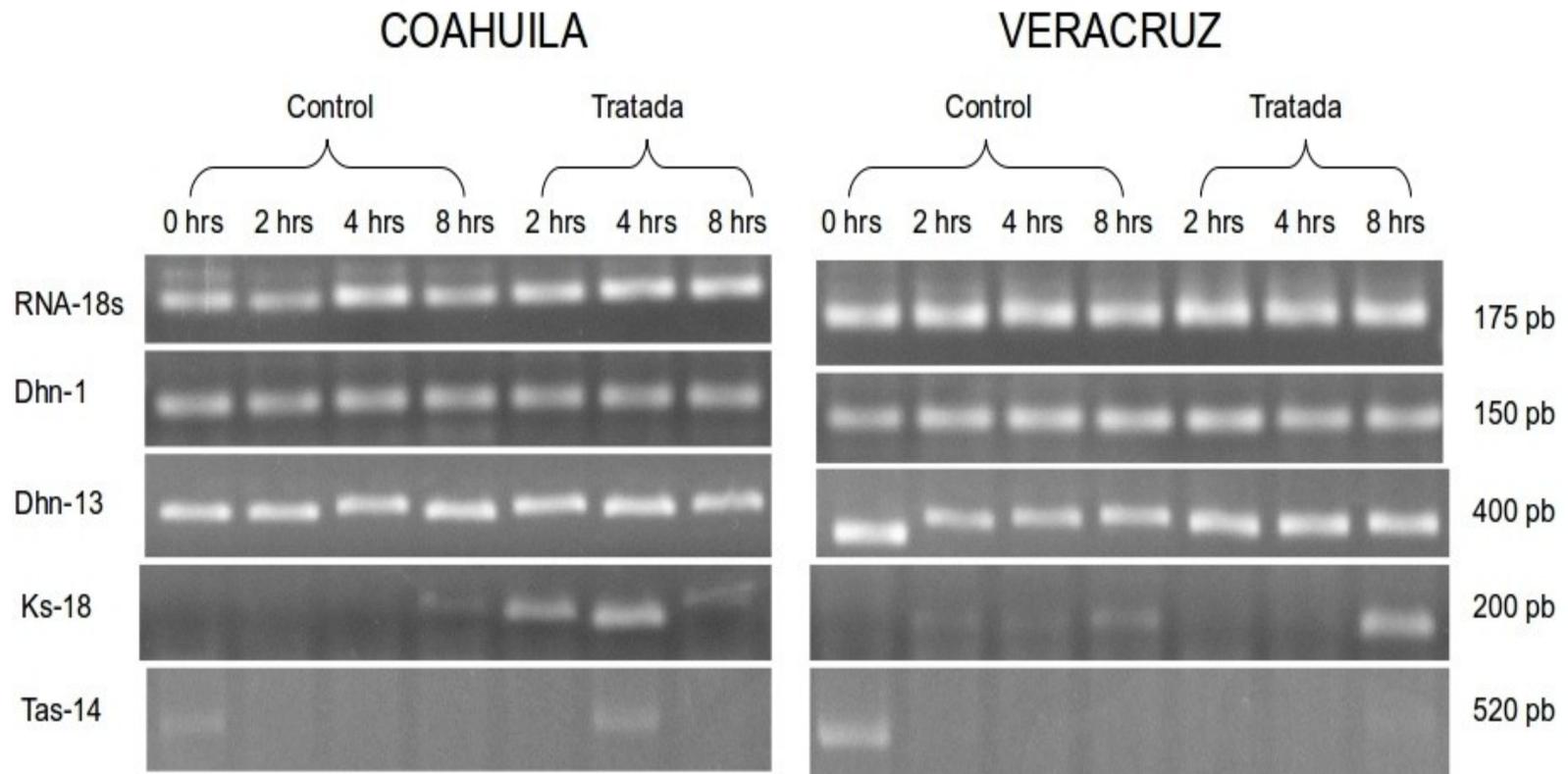


Figura 5. Expresión de *Dhns* por RT-PCR en chile piquín de la población de Veracruz y Coahuila bajo condiciones de estrés hídrico *In vitro*.

IV. ARTICULO II
**CARACTERIZACIÓN DE LA DEHIDRINA Tas14 EN CHILE (*Capsicum*
annuum L).**

INTRODUCCIÓN

El estudio de dehidrininas ha dado pistas para considerar que sus genes responden a estrés por diversos factores abióticos como sequía y frío. Entre los estudios previos en solanaceas se tiene que Godoy *et al.* (1990) sometieron a plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. Rutgers) a estrés salino y aplicación de ABA por 24 h; con el análisis por Southern blot encontraron que en hojas de tomate el mRNA de *Tas-14* incrementa sustancialmente con los tratamientos de estrés salino y aplicación de ABA, mostrando además un efecto aditivo. Los autores sugieren que la inducción sistemática de *Tas-14* por ABA y estrés salino pueden jugar un papel importante en la respuesta de las plantas a estrés osmótico y por salinidad.

El estudio de la dehidrina Ks18 en Chile fue iniciado a partir de la identificación de ESTs en una biblioteca de cDNA de Chile (denominada KS). Varias secuencias parecen codificar para proteínas con el segmento K característico de las dehidrininas. Una de éstas mostró alta similitud con el gen *dhn-1* de papa silvestre (*Solanum commersonii*). Baudo *et al.* (1996) reportó a *S. commersonii* como una especie resistente a heladas en comparación con especies cultivadas, los autores estudiaron la expresión del gen *dhn-1* bajo tratamientos de ABA y baja temperatura, el análisis reveló que la inducción del gen fue relativamente rápida y en grandes cantidades de transcritos después de un día

de tratamiento de baja temperatura y a las 7 h para el tratamiento de ABA.

Aunque se cuenta con información de estos genes en papa y tomate, no se conocen en Chile. El conocimiento de las secuencias de estos genes abriría la puerta para utilizar las dehidrinas como marcadores moleculares para respuesta a estrés por diversos factores abióticos como sequía, frío y salinidad y su uso en programas de mejoramiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y extracción de DNA

Se utilizaron hojas de plantas adultas de chile piquín en etapa de producción de una población de Coahuila.

Se hizo extracción de DNA total de acuerdo a la metodología de Doyle y Doyle (1987), a partir de 100 mg de tejido fresco de hoja, primeramente se pulverizó en un mortero con nitrógeno líquido y se agregó buffer de lisis (2% de CTAB, 100 mM de Tris HCl pH 8, 20 mM de EDTA pH 8, 1.4 M de NaCl, 1% de Polivinil pirrolidona y 0.2% de β -mercaptoetanol), se mezcló y se incubó por 45 min a 65° C. Posteriormente se agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Al sobrenadante se le agregó 0.5 volúmenes de acetato de amonio 3.3 M pH 6.1 y 0.6 volúmenes de isopropanol, se dejó precipitar por 30 min, y posteriormente se centrifugó a 10.000 rpm por 20 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y la pastilla de DNA se lavó dos veces con etanol al 70%. Finalmente la pastilla se disolvió en TE 0.1X (10 mM de Tris pH 8 más 1 mM de EDTA pH 8). El DNA extraído se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm y se estimó su calidad en una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% en TAE 1x (40 mM de Tris, 5 mM de acetato de amonio y 0.7 mM de EDTA pH 7.6).

Secuenciamiento del gen de la dehidrina Tas14

En trabajos previos del laboratorio, se amplificaron y secuenciaron fragmentos de la región traducida de los genes para diferentes dehidrinas entre ellas, la Tas14. Sin embargo, éstos son fragmentos incompletos del gen que no incluyen toda la secuencia codificante. Con el fin de conocer la secuencia codificante, deducir la secuencia completa de la proteína y avanzar en el conocimiento de las regiones del promotor de este gen se recurrió a la técnica de “Genome Walking” que consiste en la amplicación por PCR de secuencias desconocidas de DNA genómico que se encuentran adyacentes a secuencias ya conocidas. Se utilizó el kit Genome Walker™ (Clontech, Mountain View, CA, USA) usando primers para el gen específico (GSP1 y GSP2) siguiendo las recomendaciones descritas en el kit.

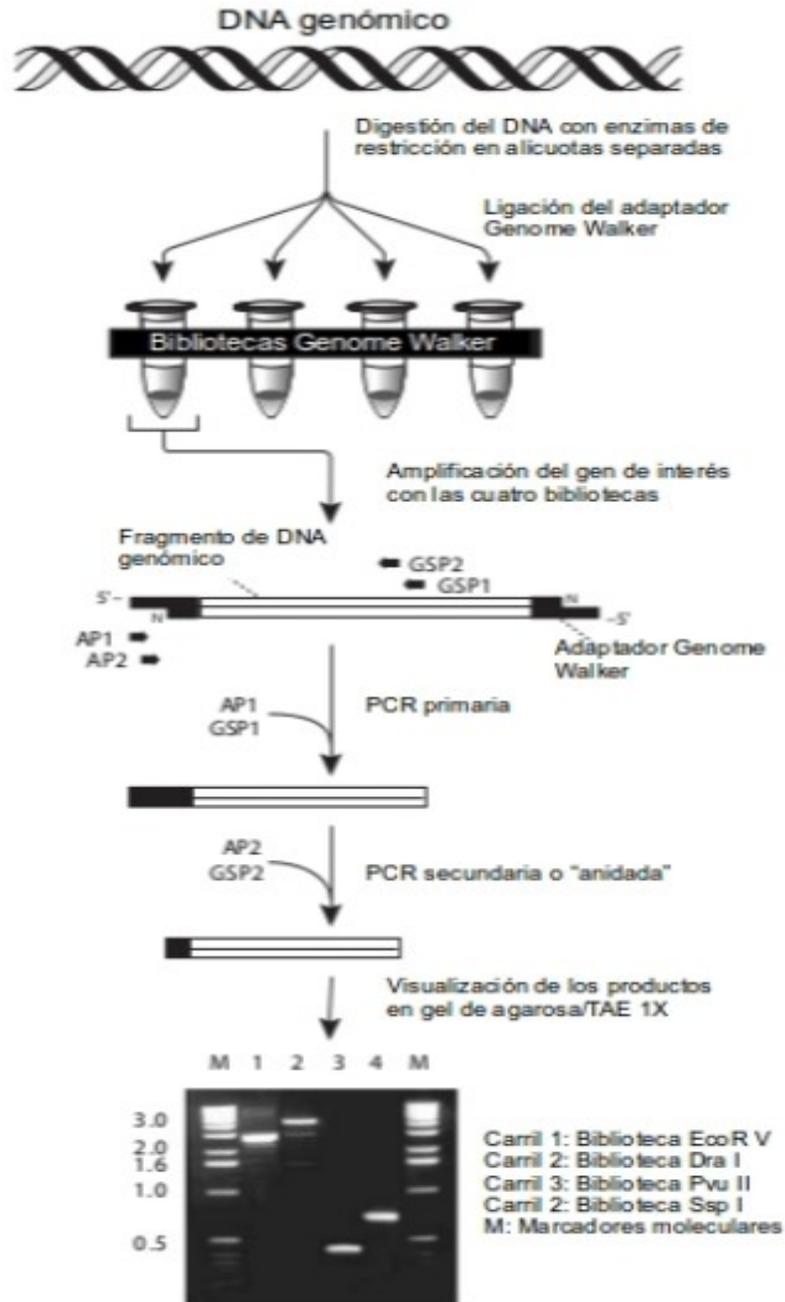


Figura 1. Diagrama de flujo del protocolo Genome Walking™. La figura muestra al final un resultado típico generado con bibliotecas Genome Walking en humano utilizando primers específicos de genes.

De acuerdo al diagrama de flujo de Genome Walking, primero el DNA genómico aislado de hojas de chile piquín se digirió con las cuatro enzimas de restricción

(Dra I, Pvu II, Stu I y EcoR V) incluidas en el kit, después las muestras de DNA digeridas se ligaron a un adaptador de secuencia Genome Walker™ (AP1). Posteriormente se hizo una primera PCR usando el primer (oligonucleótido cebador) AP1 y el primer del gen específico de las siguientes dehidrasas: GSPTas14 5'-TATTGTGCCATCTCCTTTCTCTCT-3' de lado 5' río arriba y GSPKS18 5'-CTAGTGGAAGGATAATCACACAGGTAG-3' del lado 3' río abajo. La PCR se desarrolló en 50 µl por reacción utilizando JumpStart Taq®, con las siguientes condiciones de PCR: 94° C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 25 s a 94° C, para el alineamiento fueron 2 min a 67° C, para la extensión fueron 60 s a 72° C, con una incubación final de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR de cada reacción fueron usados como molde en una reacción de PCR anidada, la cual fue desarrollada con el primer AP2 y el primer del gen específico GSPTas14 5'- CTCTCTCTGATCAAACTCAAAAACAC-3' y GSPKS18 5'-GTACGTTGTATCATGTACCTCGTTATG-3', las PCR fueron realizadas en 50 µl por cada reacción utilizando JumpStart Taq®, las condiciones de PCR fueron igual a las condiciones anteriormente descritas.

Los productos de PCR fueron analizados utilizando una electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % en TAE 1X. Los fragmentos de mayor peso molecular de las dehidrasas Tas14 5' y Ks18 5' fueron purificados a partir del gel de agarosa utilizando el kit de purificación de DNA genómico Wizard® de acuerdo a la metodología descrita en el kit. Posteriormente fueron reamplificados utilizando JumpStart Taq® con las mismas condiciones de PCR anteriormente descritas.

Clonación del gen Tas14

Con el fin de contar con suficiente material para su secuenciación los fragmentos amplificados mediante “genome walking” fueron clonados en el plásmido pGEM-T easy, que permite la incorporación directa, sin digestión de los productos de PCR.

La clonación se llevo a cabo utilizando el kit pGEM-T Easy Vector® (Promega, Madison, USA). Debido a que las Taq polimerasa deja en los extremos de cada cadena del fragmento amplificado, un residuo de adenina extra, el fragmento puede ser incorporado directamente al plásmido linearizado que a su vez, cuenta con un residuo extra de timina. Esto se realizó mediante una reacción de ligamiento en una mezcla que contenía el producto de PCR de Tas14, 60 mM de Tris-HCl pH 7.8, 20 mM de MgCl₂, 20 mM de ATP y 10% de polietilenglicol mw800, 50 ng de vector pGEM-T Easy y 3 U/μl de T4 DNA ligasa se dejó incubar por 16 h. La transformación de bacterias se desarrolló en un tubo Eppendorf utilizando 2 μl de cada reacción de ligación más 50 μl de células competentes de alta eficiencia (Promega, Madison, USA, JM109, >10⁸ UFC/μg), se mezcló por inversión y se incubaron por 20 min a 2° C, posteriormente se les aplico shock térmico a las células durante 45 s en circulador de agua a 42° C, después se regresaron inmediatamente a 2° C durante 2 min, enseguida se agregaron 150 μl de medio de cultivo SOC el cual contenía: 2% de triptona, 0.5% de extracto de levadura, 100 mM de NaCl, 25 mM KCl, 200 mM de glucosa esterilizada por filtración y 20 mM de solución madre de Mg²⁺ (20.33 g de MgCl₂·6H₂O más 24.64 g de MgSO₄·7H₂O en 100 ml

de agua esterilizado por filtración). Los tubos se incubaron durante 1.5 h a 37°C con agitación a 200 rpm. Se tomaron 100 µl de las células transformadas y se distribuyeron sobre placas selectivas de medio de cultivo LB (cantidades por litro: 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y 15 g de agar, pH 7) adicionadas con 100 µg/ml de ampicilina y con 100 µl de IPTG (100 mM) y 100 µl de X-Gal (20 mg/ml) que se adicionaron inmediatamente antes que las bacterias. Finalmente las placas se incubaron por 24 h a 37°C.

El éxito de la clonación depende de la inserción del fragmento en el vector. Cuando esto ocurre, la secuencia de codificación de β-galactosidasa se interrumpe y las bacterias transformadas que contienen el plásmido con el inserto, pierden esta actividad enzimática. Las colonias con y sin inserto pueden ser diferenciadas por el color blanco de las que tienen el inserto y azules las que desarrollan el color por la reacción con el X-gal. Se tomaron 8 colonias transformantes de Tas14 5' y se crecieron en medio de cultivo LB líquido en agitación constante a 150 rpm a 37°C por más o menos 14 h.

Extracción de DNA plasmídico

Para demostrar que las clonas contienen un inserto del tamaño esperado, se realizó una extracción del DNA plasmídico, digestión para liberar el inserto y una electroforesis para su observación.

Los tubos con las células se centrifugaron, se descartó el sobrenadante y se agregaron 150 µl de buffer SET (20% sacarosa, 50 mM de Tris-HCl pH 8, 50 mM de EDTA pH 8) y 5 µl de solución de RNasa (5 mg/ml en 10 mM de Tris pH

7.5, 15 mM de NaCl, calentado a 10°C por 15 min para eliminar cualquier actividad remanente de DNasa), se mezcló en vortex par suspender completamente las células, se incubó a 2°C por 10 min y se agregaron 250 µl de buffer de acetato de potasio (60 ml de acetato de potasio 5 M, 11.5 de ácido acético glacial y 28.5 de agua, pH 5.2). Se mezcló por inversión y se incubó a 2°C por 10 min, después se centrifugaron los tubos por 5 min a 4°C. El sobrenadante se pasó a nuevos tubos Eppendorf y se les agregó un volumen de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se centrifugó por 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante. Después a la pastilla se lavó con 500 µl de etanol al 70%. Posteriormente se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Finalmente la pastilla de DNA se disolvió con 20 µl de buffer TE. Para liberar el inserto del plásmido se utilizó la enzima de restricción EcoR I y finalmente se hizo electroforesis en geles de agarosa al 1.5 % en TAE 1X. Muestras del plásmido que contienen el inserto con el tamaño esperado fueron enviadas para su secuenciación a la empresa MacroGen (Seul, Corea).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De acuerdo a la digestión del DNA con las cuatro enzimas de restricción, las enzimas que mostraron fragmentos más grandes fueron *Stu I* y *EcoR V*. En la figura 2 se observa la PCR primaria, la flecha uno de izquierda a derecha indica que en el carril aparecen al menos 3 fragmentos que van de los 500 a 1200 pb. En teoría, los fragmentos de restricción son en promedio de 6.000 pb, el tamaño de los amplicones derivados de la PCR dependerá de la distancia del gen estudiado al sitio de restricción.

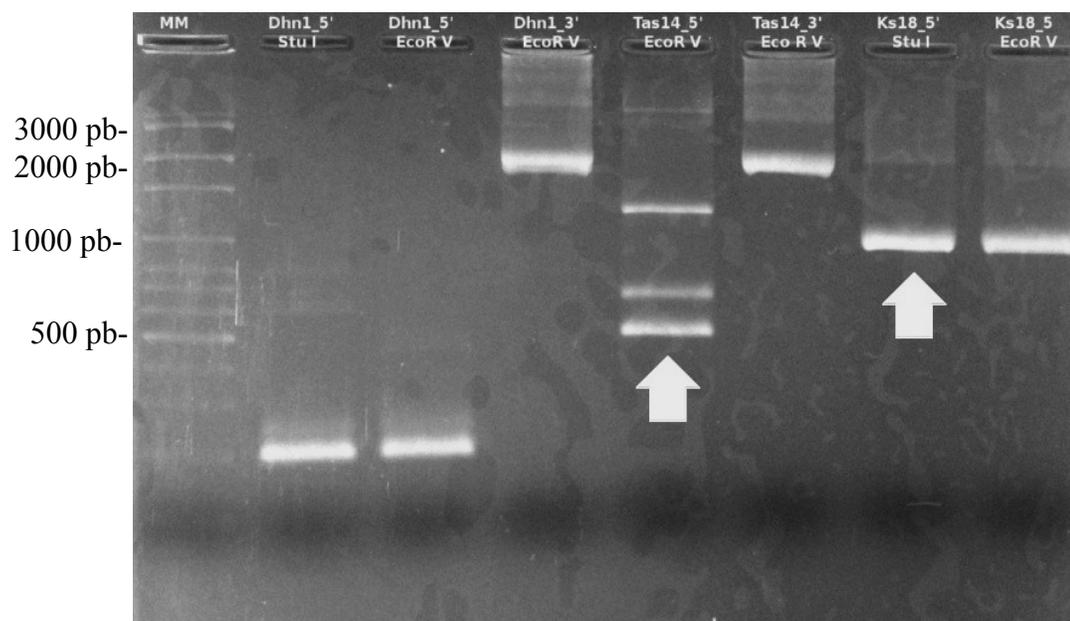


Figura 2. Electroforesis de productos de la PCR primaria en el procedimiento de “genome walking” se especifica en cada carril el origen de cada muestra, de que dehidrina procede y a que lado del gen (5' o 3') corresponde, así como de cual biblioteca de restricción fue obtenida. En el primer carril, MM son marcadores de peso molecular.

Con el fin de obtener menos productos de la amplificación y más limpios se hizo una PCR secundaria o anidada a partir de una dilución 1:50 del producto de la reacción primaria. En la figura 3 se observan los productos de PCR secundaria,

la primer flecha de izquierda a derecha señala fragmentos del gen Tas14 5', de él cual no se logró obtener un fragmento mayor a 1000 pb, a pesar de que en la PCR primaria si aparecen fragmentos de más o menos 1200 pb. La siguiente flecha señala fragmento del gen Ks18 5' en este caso el fragmento obtenido en la PCR primaria también se obtuvo en la PCR secundaria.

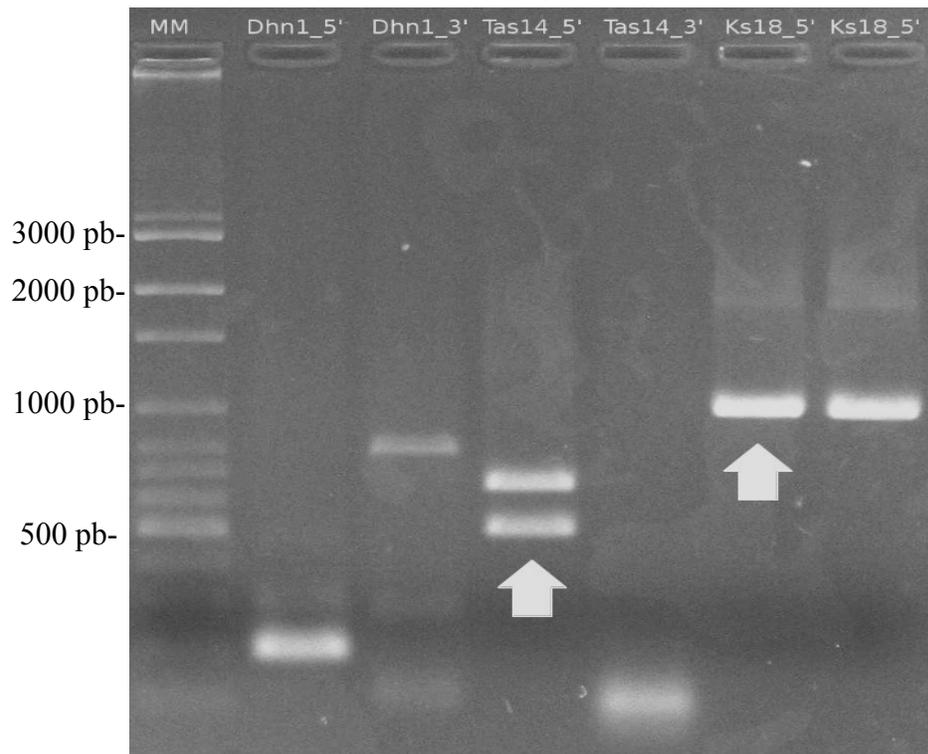


Figura 3. Electroforesis de productos de PCR secundaria. En el primer carril, MM son marcadores de peso molecular. La identificación de cada muestra es similar a la figura anterior.

Rishi *et al.* (2004) señalan que la obtención de fragmentos largos río arriba está directamente relacionado con la polimerasa utilizada en la PCR, en este caso los autores utilizaron polimerasa AmpliTaq Gold® y FailSafe™ y obtuvieron

fragmentos de aproximadamente 400 pb hasta 5 Kb, en nuestro trabajo se utilizó una mezcla de PCR que incluye una Taq polimerasa JumpStart Taq®.

En la figura 4 se observan las digestiones de los vectores que contienen las clonas de los fragmentos del gen Tas14 5' y Ks18 5'. En general se obtuvieron fragmentos de buen peso molecular aparentemente limpios e íntegros, en lo que respecta a la técnica de Genome Walking® utilizada en la presente investigación mostró ser muy eficiente en la obtención de fragmentos río arriba de dehidrinas.

Los fragmentos de la PCR secundaria fueron extraídos del gel, purificados, reamplificados y clonados en el vector pGEM-T easy. Los Clones se mandaron secuenciar a MacroGen (Seul, Corea).

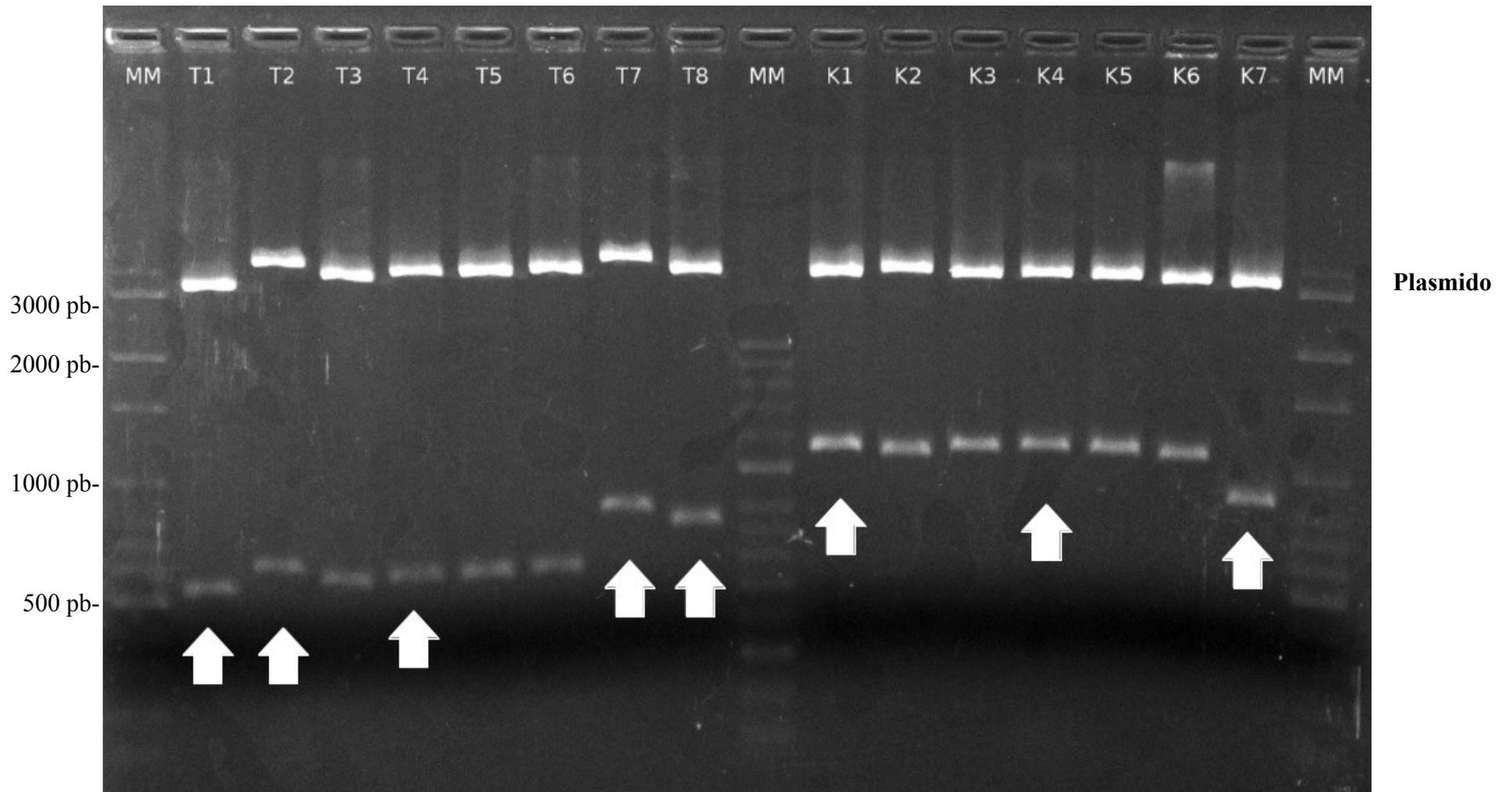


Figura 4. Electroforesis de clones de Tas14 5' y Ks18 3'. MM son marcadores de peso molecular. T= Tas14 5', K=Ks18 3'. Las flechas indican los insertos liberados por EcoR I del plasmido.

Análisis de la secuencia obtenida por “genome walking”

Debido a que solo se obtuvo secuencia del lado 3' de Ks18 no se analizó su estructura. La secuencia obtenida de Tas14-5' fue analizada en el software CodonCode Aligner, se quitaron los extremos de baja calidad y se hizo contig con las secuencias de ambas cadenas.

En VecScreen (<http://www.ncbi.nih.gov/tools/vecscreen/>) se detectaron las secuencias del vector y del adaptador de Genome Walking y se eliminaron para dejar la secuencia limpia en apenas 610 pb. Esta secuencia se juntó en CodonCode Aligner con la ya conocida previamente en el laboratorio (1160 pb). La unión da como resultado, el primer ensamble Genome Walking de la Tas14 con 1648 pb, esta secuencia incluye parte del promotor (figura 5).

La caja TATA está en la posición 464, por lo que hay oportunidad de detectar algunos elementos cis.

```

ctatgagtcatagctgctgctctcttactatgccacgtttacggctataaaagttgcacgctggtgctacgtacaaaatgaatcttccttgatattgcagtccttgaatgcagcaaagtgtcg < 125

acgatttactttactttctcttttttccggttaaataaaaaccatccaccatgtatctttatgaattatgaccagtcaatacacTTGGCttccactctatgctcttagatgtcactcgagtgtc < 250

tttttccacttccgtaagttccactgttctttatttcagctaaatatcttcttaccatctttaattcatgttccagccgacactttcacacttgtctccaatcttctgctgccacgettta < 375

ccattcttaccggaaaatcctcaattccatttgtcacttaaacactgttatgccccgagttagccttttctacttctcctttgctatataaatccctactccatgcagctctttccatcaca < 500
                                     >TATA Box
                                     |
aaaccaaactTAATFACTTCTTGTGATTGCAATAGCAAAATACAAGTGAAAAACAGTGGTTCCTTTTTTTttrTCCCTGtTTGTAAGTGTTTTGTGAGTGTGATCAGAGAGAGaaggagatgg < 625

cacaatacgggtgaccaagaccaaagtcgccagactgatgaatatggaaccgcgtccaagaaaactgggggcatgggaactggaggctatggaactcaccaaggtactgggtatgggggcatgggt < 750
                                     >UTR-5'
                                     |
gccactgggtggtatgggagacactggtggaatggggccatgggtggaggtactggcactggaatgggtatgggcaactcagggcactgggtacgggcatgggtatgggtactgggtca < 875
                                     >Exon 1
                                     |
ccatgagggacaacagcagcttcgtcgatccgacagctctagctctgtaagtttactcttattccttttatttctgtacgcttaaatatgctggtccatattgtcacaatatcattattatgg < 1000

aacatataagacacgtcatataaatgaattgaggatatttatttttcttttctccagtatttgatattaatatgctggtttgtgttaaatttccagtgggaggatgatggacaaggtgggag < 1125
                                     >Intron
                                     |
gagaaagaagggcataaaggagaagataatggagaagatgccaggaggacatggccaacaggaaggcactgaatatggtcaacatgggcaaacactactactactacttattggtactactgaag < 1250
                                     >Exon 2
                                     |
aagctggagagaagaaggaatgatggacaaaatcaaggacaagatccctgggatgcatgaaacaatattgtgatcatcctttgtttcattttcagcttatgaataagtgcttaaaaatagtg < 1375

cctgattttatttcatgcaactgattagtagtaagtgtgatgtgagttatttccaatggtgtgtttaagggcagtgctcacgccatggtgtatatcgggggccatgcccggtccttttctgt < 1500
                                     >UTR-3'
                                     |
aattctcaaggaaagtgcgtctactgtggtgtataagggatttctcctatgctggaagcagtgatgccatgtccatcatgttaatgtgtgtggtccatctttaatgatgttttgaaa < 1625

taatattaagtttaattgtgct < 1648

```

```

Features :
Exon 1      : [814 : 921]
Intron     : [922 : 1100]
Exon 2     : [1101 : 1312]
TATA Box   : [464 : 470]
UTR-5'     : [511 : 813]
UTR-3'     : [1313 : 1648]

```

Figura 5. Secuencia de la dehidrina Tas14 obtenida por Genome Walking y ensamblada con el software CodonCoder. Los colores indican la estructura del gen.

Se hizo el alineamiento con el software ClustalW del cDNA de Tas14 de la base de datos del CINVESTAV con la secuencia genómica aquí obtenida y posteriormente en el software Unigene se hizo la traducción de aminoácidos, la secuencia de aminoácidos que se dedujo es:

```
1 MAQYGDQDQM RQTTDEYGNRV QETGGMGTGG YGTHQGTGMG GMGATGGMGD
51 TGGMGAMGGG TGTGMGMGTG GTHGTGTGMG MGTGHHEGQQ QLRRSDSSSS
101 SEDDGQGRR KKGIKEKIME KMPGGHGQQE GTEYGQHGQT TTTTTYGTTE
151 EAGEEKKGMD KIKDKIPGMH
```

Figura 6. Secuencia proteica deducida de la secuencia del gen *tas14*. Las secuencia marcadas en negritas son: TDEYGNR segmento Y, SDSSSS es el segmento S, KKGIKEKIMEKMPG es un segmento K y EKKGMDKIKDKIPG es otro segmento K.

Nuestra secuencia de aminoácidos tiene un segmento-Y, un segmentos -S, y dos segmentos K, por lo que de acuerdo con el sistema de clasificación de esas proteínas, Tas14 en Chile es una dehidrina tipo YSK₂. Tiene un peso molecular de 17.39 kDa, un punto isoeléctrico de 6.39 y es particularmente hidrofílica: de los 170 residuos de aminoácidos, 87 son polares y de los 83 hidrofóbicos, 49 son residuos de glicina. Carece de cisteína, fenilalanina y de triptofano, en cambio, treonina, lisina, metionina y glutamina son muy abundantes.

```

CaTas14  MAQYGDQDQMRQTDEYGNRVQETGGMGTGGYGTHQGTGMGGMGATGGMGDTGGMGAMGGG
SlTas14  MAQYGNQDQMRKTDEYGNHVQET-----GVYQGT-----GTGGMMGG
StTas14  MAQYGNQDQMRKTNEYGNHVQET-----GTHQGTGMGGMQA-----GTGGMMGG
          *****:*****:*.*****:*****          *.:***          * *.* **

CaTas14  TGTG--MGMGTGGTHGTGT--GMGMGTG--HHEGQQQLRRSDSSSSSEDDGQGRRKKGI
SlTas14  TGTGGMMG-GTGGEYGTQ----GMGTGTHHHEGQQQLRRSDSSSSSEDDGEGRRKKGL
StTas14  MGTGG-MG-GTDGGYGTRTGMGMGTGTHHHEGQQQLRRSDSSSSSEDDGEGRRKKGM
          ***  * * * * . * : **          *****  *****:*****:*****:

CaTas14  KEKIMEKMPGGHGQQEGTEYQHGQTTTTTTTYGTTEEAGEKKGMMDKIKDKIPGMH
SlTas14  KEKIMEKMPGQH---EG-EYQT-----TGE---EKKGMMDKIKDKIPGMH
StTas14  KEKIMEKMPGGG---HGQQEGQT-----TGEGAGEKKGMMDKIKDKIPGMH
          *****          . * : **          * *          *****:*****:

```

Figura 7. Alineamiento múltiple entre las secuencias proteicas de la dehidrina Tas14 de Chile (CaTas14), de tomate (SlTas14) y papa (StTas14). Los segmentos característicos están marcados. El segmento Y en negritas, el segmento S en negritas y cursivas y el segmento K en negritas y subrayado. Las posiciones completamente conservadas están marcadas con asterisco. Las sustituciones conservadas están marcadas con dos puntos y las semiconservadas con un punto.

Posteriormente se alineó nuestra secuencia de aminoácidos con las secuencias depositadas en el GenBank de tomate (*Solanum lycopersicum*) y de papa (*Solanum tuberosum*) como aparece en la figura 7.

Según el alineamiento, las secuencias muestran que los segmentos típicos de esta dehidrina subclase YSK₂ son muy similares. Sin embargo, la proteína de Chile es mayor, con una inserción de un cassette de tirosinas entre los segmentos K y dos regiones ricas en glicina y metionina entre los segmentos Y y S.

Godoy *et al.* (1990) encontraron que en tomate la aplicación de ABA y estrés salino induce la expresión de Tas14. Los autores sugieren que en la región del promotor (analizaron 2,000 bp río arriba del sitio de iniciación de la transcripción) existen diferentes elementos *cis*- actuando en la regulación del Tas-14 y esto puede jugar un papel muy importante en la respuesta de las

plantas a estrés hídrico y estrés salino.

Con la secuencia obtenida de Chile se hizo análisis de la región del promotor que fue posible secuenciar, en http://plantpan.mbc.nctu.edu.tw/seg_analysis.php. Con fines de comparación se hizo lo mismo con la región del promotor de Tas14 de tomate (figura 8).

El análisis del promotor de la secuencia obtenida de Tas14 de Chile reveló varios elementos cis- entre otros, los más importantes son: MYBST1, CBF-HV, DPBF-COREDC-DC3, que están relacionados con la respuesta a estrés hídrico. Baranowski *et al.* (1994) describieron el factor transcripcional MYBST1 que se une a la secuencia GGATA, en nuestro trabajo se ubicó en el sitio 91, según nuestra comparación hecha en regiones del promotor en tomate, este elemento MYBST1 se encontró en el sitio 137.

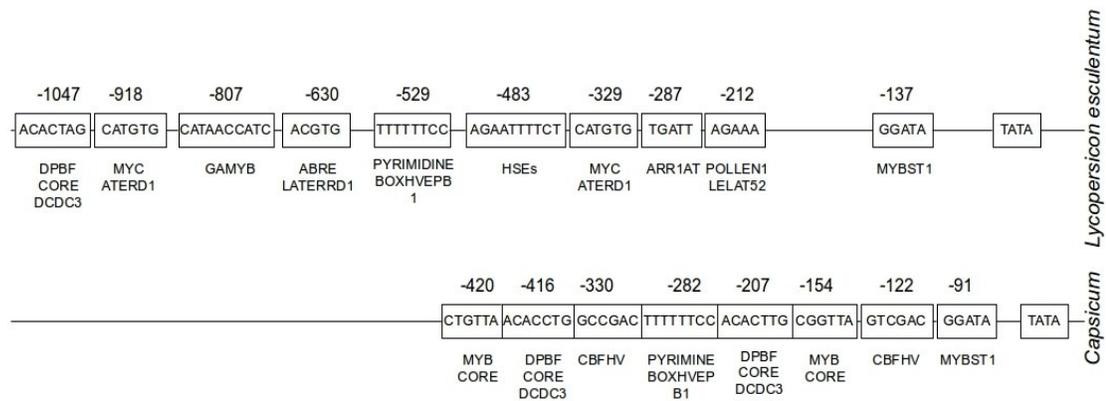


Figura 8. Comparación de elementos cis en la región promotora de Tas14 en tomate y Chile. En tomate se analizaron más o menos 1000 pb río arriba. En Chile se analizaron más o menos 400 pb.

En nuestro análisis se encontraron elementos CBF-HV en la secuencia de

Tas14 de chile, en otro estudio se encontró que los elementos de cis- CBF (Hv es de *Hordeum vulgare*) en cebada también se reconocen como elemento sensible a deshidratación, vinculando con elementos cis- DRE y DREBS (Xue GP, 2002). En la figura 8 de la comparación de elementos cis- en chile y tomate tenemos que los elementos CBFHV no se encontraron en tomate, aunque si se encontraron elementos MYBST1. Los elementos cis- CBF-HV, son responsables de la expresión génica durante la deshidratación y etiolación.

En el análisis del promotor en la secuencia de Tas14 se encontraron 2 elementos cis- llamados DPBF-COREDC-DC3 uno a 207 y otro a 416 pb río arriba. Los factores de transcripción DPBF 1 y 2 (factor de unión al promotor Dc3; Dc es de *Daucus carota*), determinan especificidad de expresión en el embrión y también inducción por ABA (Kim *et al.*, 1997).

Estos elementos claramente apuntan a una inducción de *Tas14* por ABA y por estrés hídrico en *Capsicum annuum*. Sin embargo, en nuestros ensayos de expresión, no se observó una inducción de la expresión de este gen durante el desarrollo del estrés hídrico. Una posible explicación, es que esta inducción se da solo en plántulas, pues es en este estado de desarrollo donde se han realizado la mayor parte de los ensayos, por ejemplo, véase Chung, et al (2003), Tomassinii et al (2008).

CONCLUSIONES

De acuerdo a las metodologías realizadas en laboratorio e *in silico* se tienen las siguientes conclusiones:

- El método de genome walking estandarizado en el laboratorio, mostró ser relativamente sencillo y eficiente.
- Fue posible clonar de manera correcta los genes *Tas14* 5' y *Ks18* 3'.

El análisis de la secuencia (464 pb) obtenida por Genome Walking de la región del promotor del *Tas14* permitió identificar factores *cis* relacionados con respuesta a estrés hídrico y ABA.

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Melendez, A., P. L. Morell, M. L. Roose, and S.-C. Kim. 2009. Genetic diversity and structure in semiwild and domesticated chiles (*Capsicum annuum*; Solanaceae) from Mexico. *Am. J. Bot.* 96: 1190-1202.
- Baranowskij N, Frohberg C, Prat S, Willmitzir L. 1994. A novel DNA binding protein with homology to Myb oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator. *EMBO Journal* 13 (22): 5383-5392.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Gaciarrubio A, Campos F, Covarrubias A. 2008. The Enigmatic LEA Proteins and Other Hydrophilins. *Plant Physiology*. 48: 6-24.
- Baudo M, Meza-Zepeda L, Palva T, Heino P (1996). Induction of homologous low temperature and ABA-responsive genes in frost resistant (*Solanum commersonii*) and frost-sensitive (*Solanum tuberosum* cv. Bintje) potato species. *Plant Molecular Biology*. 30: 331-336.
- Beck H., Fetting S., Knake C., Harting K, Bhattarai T. 2007. Specific and unspecific responses of plants to cold and drought. *Journal Bioscience*. 32(3) 501-510.

Boyer, J. S. 1982. Plant Productivity and Environment. Science. 218: 443-448.

Campbell S. A. y Close T. J. 1997. Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. New Phytologist. 137: 61-74.

Caramelo J. J., Lusem N. D. 2009. When cells lose water: Lessons from biophysics and biology. Progress in Biophysics and molecular biology. 99. 1-9.

Close T. J. 1996. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of family of plant dehydration proteins. Physiologia Plantarum. 97: 795-803.

Close T. J. 1997. Dehydrins: A commonalty in the response of plants to dehydration and low temperature. Physiologia Plantarum. 100: 291-296.

Close T. J., Fenton R. D., Moonan F. 1993. A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. Plant Mol Biol 23: 279-286.

Chung E, Kim S, Yi S, Choi D (2003). *Capsicum annuum* Dehydrin, An

Osmotic-Stress Gene In Hot Pepper Plants. *Molecules and Cells*.
15:327-32.

Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 19870. A rapid total DNA preparation procedure
for fresh plant tissue. *Focus* 12:13-15.

Eshbaugh, W., (1993) "History and Explotation of a Serendipitous New Crop
Discovery" en J. Janick and J. E. Simon (eds.) *New crops*. New
York, Wiley.

Galmarini C. 1999. El genero (*Capsicum*) y las perspectivas del
mejoramiento genético del pimiento en Argentina. *Avances en
horticultura* 4: 24-31.

Godoy J, Pardo J, Pintor-Toro J (1990). A tomato cADN inducible by salt
stress and abscisic acid: nucleotide sequence and expression
pattern. *Plant Molecular Biology*. 15: 695-705.

Hernández-Verdugo S, López-España R, Porras F, Parra-Terraza S,
Villareal-Romero M, Osuna-Enciso T. 2010. Variación en la
germinación entre poblaciones y plantas de chile silvestre.
Agrociencia. 44(6):667-677.

Kim Y, Chung H, Thomas T. 1997. Isolation of a novel class of bZip transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *The Plant Journal*. 11(6): 1237-1251.

Medina T, Sánchez G, Villalón H, Carreón A, Lara M. 2009. Chile piquín en Tamaulipas: conservación in situ y su aprovechamiento sostenible, propuesta. *Memorias de la Sexta convención mundial del chile*. Mérida, Yucatán, México. 81-86p.

Murillo-Amador, B., Troyo-Diéguez, E., López-Cortés, A., Jones, H. G., Ayala-Cairez, F. And Tinoco-Ojaguren, C. 2001. Salt tolerance of cowpea genotypes in the emergence stage. *Australian Journal of Experimental Agricultura*, 41:82-88.

Nabhan G. 1985. "For the Bird: the Red-hot Mother of Chiles", en *Gathering the Desert*. Tucson, Arizona, The University of Arizona Press, pp. 123-133.

Nabhan, G.; Slater M. y L. Yarger, (1990) "New Crops Small Farmers in Marginal Lands? Wild Chiles as a Case Study" en M. Altieri M. y S. Hecht, S. (eds.) *Agroecology and Small Farm Development*, EUA, pp. 19-34.

Nieto-Garibay A, Murillo-Amador B, Troyo-Diéguez A E, García-Hernández J, Ruíz-Espinoza F. 2010. Water stress in two capsicum species with different Domestication grade. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 12: 353-360.

Nieto-Garibay A, Troyo-Diéguez E, García-Hernández J, Murillo-Amador B, Ruíz-Espinoza F, Pimienta-Barrios E. 2009. Efecto del estrés hídrico edáfico en emergencia y desarrollo de plántula en las especies de Chile *Capsicum frutescens* L. y *Capsicum annum* L. Tropical and Subtropical Agroecosystems. 10:405-413.

Parra R. A., Rodríguez J. L., González V. A. 1999. Transpiración, potencial hídrico y prolina en zarzamora bajo déficit hídrico. Terra. 22 (2):125-130.

Rodríguez M., Canales E., Borrás-Hidalgo O. 2005. Review: Molecular aspects of abiotic stress in plants. Biotecnología aplicada. 22: 1-10.

Rodríguez del Bosque, L. A., M. Ramirez Meraz y O. Pozo Capodónico. 2004. Tecnología de producción de Chile piquín en el noreste de México. INIFAP-CIRNE. Campo experimental Río bravo. Folleto técnico Num. 29. Tamaulipas, México. 33p.

Svensson J, Ismail AM, Palva ET, Close TJ (2002) Dehydrins. In: Storey KB, Storey JM (eds) Sensing, signaling and cell adaptation. Elsevier, Amsterdam.

Taiz L., Zeiger E. 2006. Fisiología Vegetal 3 rd.edición. Publicacions de la Universitat Jaume. USA. 656 pp.

Tewksbury J, Nabhan G, Norma D, Suzán H, Tuxill J, Donovan J. 1999. In situ conservation of wild and their biotic associates. Conservation Biology. 13: 98-107.

Tommasini L, Svensson J, Rodríguez E, Wahid A, Malatrasi M, Kato K, Wanamaker S, Resnik J, Close T (2008). Dehydrin gene expression provides an indicator of low temperature and drought stress: transcriptome-based analysis of Barley (*Hordeum vulgare* L.) Functional & Integrative Genomics. 8: 387-405.

Xue, G. P. 2002. Characterisation of the DNA-binding prole of barley HvCBF1 using an enzymatic method for rapid, quantitative and high-throughput analysis of the DNA-binding activity. Nucleic Acids research. 30 (15) 10-11.