

2es



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

CLONACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN DE Saccharomyces cerevisiae QUE LE CONFIERAN TOLERANCIA A ESTRÉS SALINO EN FUNCIÓN DE UNA DOSIS GÉNICA AUMENTADA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA PRESENTA NAHANNY MARISOL CANAL REYES



MEXICO, D. F.,

1999



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

275768



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

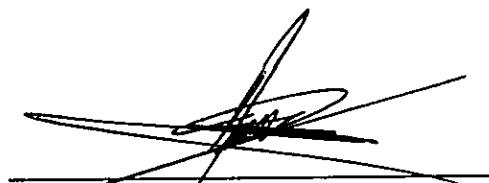
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado asignado:

Presidente	Profa. Guadalupe Velez Pratt
Vocal	Profa. Biserka Sveshtarova Pekarkova
Secretario	Prof. Jesús Fernando Montiel Aguirre
1er. Suplente	Prof. Rodolfo Pastelin Palacios
2do. Suplente	Profa. Raquel Ortega Muñoz

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 105, Departamento de Bioquímica, Edificio "E", Conjunto "E" de la Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria.



Dr. Jesús Fernando Montiel Aguirre
Asesor del tema

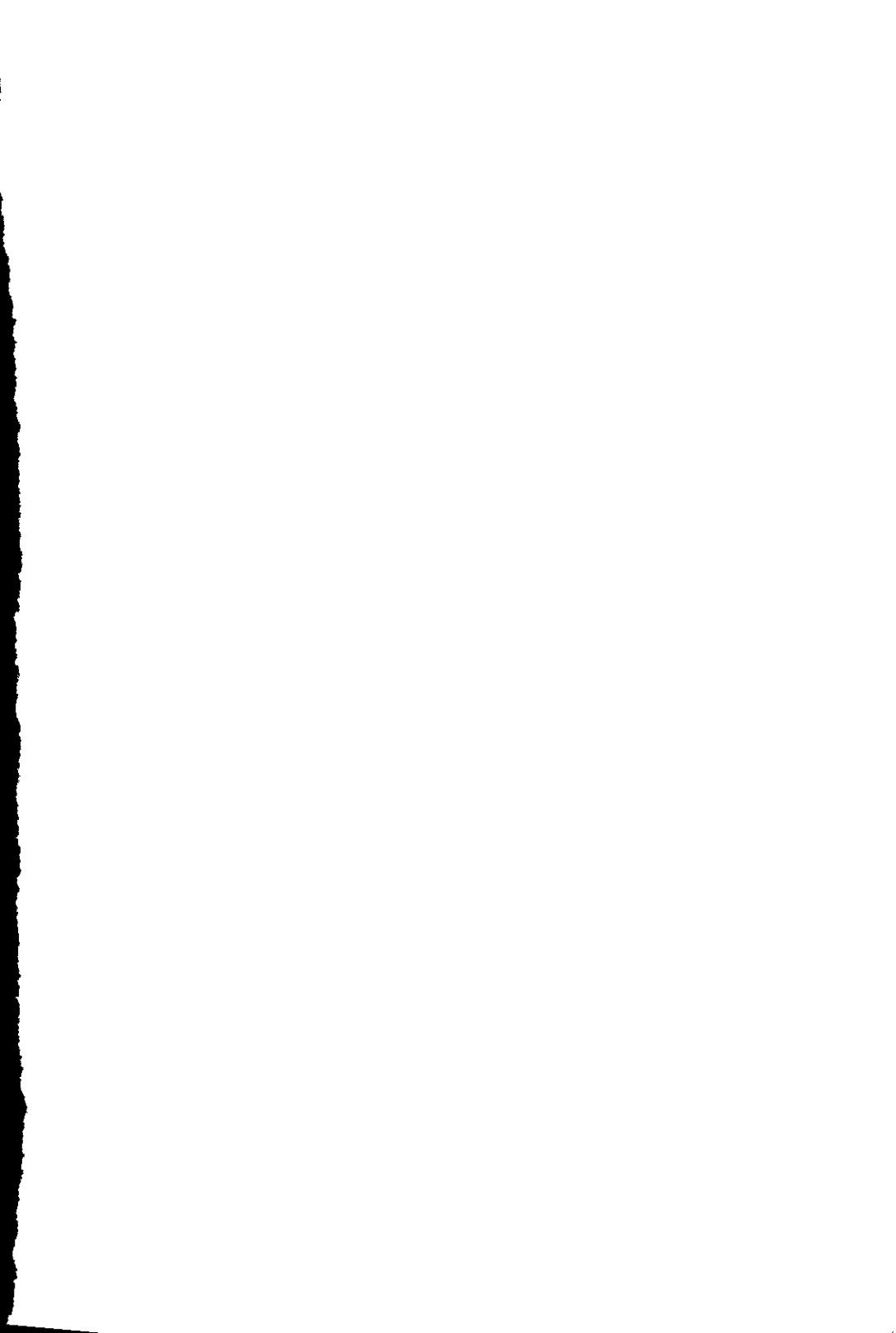


Nahanny Marisol Canal Reyes
Sustentante

CONTENIDO

I. RESUMEN	3
II. INTRODUCCIÓN	5
1. El fenómeno del estrés.	5
1.1. Antecedentes históricos	5
2. El fenómeno de la sal en la agricultura.	6
2.1. Distribución y extensión global de los suelos afectados por sal.	8
2.2. Soluciones al problema de la salinización.	9
3. El estrés por sal.	10
3.1. Estrés osmótico.	10
3.2. Osmoregulación.	11
3.3. Participación de los iones como perturbadores en la función de las macromoléculas.	12
3.4. Solutos compatibles u osmolitos protectores.	12
3.5. Toxicidad osmótica contra toxicidad iónica específica.	14
4. Funciones celulares sensibles a la sal.	16
5. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como modelo de laboratorio.	18
6. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en condiciones de estrés salino.	20
6.1. Transporte iónico en la membrana plasmática de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	21
6.1.1. Inclusión de sodio y potasio.	21
6.1.2. Exclusión de sodio.	22
6.1.3. Transporte de cloruro.	23
6.1.4. H ⁺ -ATPasa de la membrana plasmática.	24
6.1.5. Vacuola.	24
6.2. Transducción de la señal.	25
III. HIPÓTESIS	27
IV. OBJETIVOS	28

V. MATERIAL Y MÉTODOS	29
1. Material biológico.	29
2. Transformación de levadura con la biblioteca genómica.	29
2.1. Biblioteca genómica.	30
2.1.1. Construcción del banco genómico.	31
2.2. Transformación de levadura.	32
2.2.1. Cosecha de células de levadura.	33
2.2.2. Transformación.	33
3. Curvas de crecimiento.	34
4. Rescate del plásmido recombinante.	36
4.1. Extracción de ADN de levadura.	36
4.2. Electroforesis.	38
4.2.1. Preparación del gel de agarosa al 1%.	38
4.2.2. Preparación del ADN del fago lambda como marcador de peso molecular.	38
4.2.3. Preparación de la muestra de ADN de <i>S. cerevisiae</i> .	39
4.2.4. Tinción del gel de agarosa.	40
4.3. Aislamiento de la banda del plásmido recombinante del gel.	40
4.4. Transformación genética de <i>E. coli</i> .	41
4.5. Minipreparación de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> .	43
4.5.1. Método de Ausubel.	43
5. Restricción enzimática.	45
5.1. Electroforesis de las digestiones enzimáticas.	46
6. Secuenciación del ADN pasajero.	46
6.1. Midipreparación.	46
6.2. Secuenciación del inserto.	48
VI. RESULTADOS	49
VII. DISCUSIÓN	66
VIII. CONCLUSIONES	75
REFERENCIAS	76
APÉNDICE I	90
APÉNDICE II	95



I

RESUMEN

Algunos organismos en su hábitat natural se encuentran expuestos a diversos agentes estresantes. Las sales, como el cloruro de sodio, al aumentar su concentración provocan un incremento en la osmolaridad externa. El estrés salino tiene por una parte un efecto primario, el cual puede ser directo, como un daño de tipo tóxico o un daño indirecto como las alteraciones de tipo metabólico y la inhibición del crecimiento y desarrollo. Por otra parte, un efecto secundario incluye una deficiencia en la toma de nutrientes y, adicionalmente, un estrés de tipo osmótico (Csonka, 1989).

En este trabajo se clonó una secuencia de ADN del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* de 10 kb que cuando está presente en un plásmido unicopia, contribuye a la tolerancia al estrés por sal en este organismo. La sobreexpresión de este fragmento le confiere a la clona de levadura una clara ventaja, a elevadas concentraciones de NaCl (1.6 M) en medio mínimo con glucosa, en la velocidad de crecimiento en comparación a la que presenta el control (cepa RS16(a) transformada únicamente con el plásmido YCp50 sin ADN pasajero). Este fenotipo no se observa en presencia de otras sustancias osmóticamente activas y sales (sorbitol 1.6 M, LiCl 0.3 M y KCl 1.5 M), por lo que se piensa que la secuencia halotolerante ejerce su efecto sobre la toxicidad específica del ion sodio. La velocidad de crecimiento de la clona de interés se muestra ligeramente disminuida cuando la fuente de carbono adicionada al medio de cultivo con sal es galactosa. El ajuste osmótico, a través de la síntesis de glicerol como principal osmolito, es un proceso en el cual la secuencia de interés no participa. Por lo tanto, cuando utilizamos una fuente de

carbono diferente a glucosa se reduce la velocidad del anabolismo del glicerol, convirtiéndose éste en el factor limitante para el crecimiento en condiciones de estrés salino.

II

INTRODUCCIÓN

1. El fenómeno de estrés.

La adaptabilidad es probablemente una de las características más distintivas de la vida ya que las condiciones del entorno de un organismo como temperatura, luz, nutrientes, concentración de oxígeno, etc., no son constantes. Estas cambian o fluctúan a lo largo del día o de temporadas estacionales, pudiendo inclusive presentarse cambios radicales imprevistos como heladas, inundaciones, granizadas, sequías, etc. Aún en estas situaciones, los organismos responden realizando ajustes que les permiten mantener un medio interno en condiciones constantes; es así que el fisiólogo norteamericano W. B. Cannon acuñó la palabra homeostasis (griego *homos*, similar y *stasis*, estado) para designar a los procesos fisiológicos coordinados que mantienen las condiciones constantes en un organismo; estos procesos son diversos y se realizan de manera activa (Hoar, 1975).

1.1. Antecedentes históricos.

Actualmente el término estrés es aplicado a sistemas biológicos. La palabra estrés fue trasladada al terreno de la biología por el investigador canadiense Hans Selye, quien en 1936 observó que la rata, cuando es expuesta a agentes nocivos de diversa naturaleza tales como daño quirúrgico, frío y drogas, entre otros, presenta un cuadro con manifestaciones agrupables como un síndrome, en el que órganos como el timo, glándulas adrenales y nódulos linfáticos se alteran de manera similar independientemente del daño ejercido. En este trabajo pionero con ratas estresadas por choques eléctricos, Selye estableció tres estados para lo que él denominó el Síndrome de Adaptación General, GAS (General Adaptation Syndrome).

Los factores que producen el estado de estrés son denominados agentes estresantes, pero de manera general se puede considerar que cualquier factor del medio potencialmente desfavorable para los organismos es también potencialmente estresante (Levitt, 1980). A partir de estos conceptos podemos decir entonces que la resistencia al estrés es la capacidad que presenta un organismo para sobrevivir a un factor desfavorable y crecer en su presencia (Levitt, 1980).

A lo largo de la evolución orgánica se ha presentado una fuerte presión selectiva sobre los organismos procariotes y eucariotes (Yancey, 1982). El estrés puede aparecer en una célula procariota, como lo son las bacterias que habitan en un charco y deben enfrentarse a cambios en la temperatura, cantidad de sales presentes en el agua y a la falta de nutrientes.

También se puede presentar en células eucariotas vegetales, las cuales enfrentan variaciones considerables en la cantidad de agua disponible y en la cantidad de sales presentes en el suelo. Con la excepción de algunas especies halofitas, que toleran el agua de mar (NaCl 340 mM) y que probablemente se debe a adaptaciones secundarias, la mayoría de las plantas no toleran una salinidad mayor de NaCl de 50-100 mM (Downton, 1984).

Otro caso de estrés osmótico en el mundo animal es el de las células renales, las cuales se encuentran expuestas a concentraciones fluctuantes de sal y urea que alcanzan niveles molales. La célula renal se adapta osmóticamente acumulando grandes cantidades de algunos osmolitos orgánicos como sorbitol, inositol, glicilbetaina, taurina y glicerolfosfolina. La acumulación de estos compuestos protege a la célula, y sus niveles varían con la concentración extracelular de cloruro de sodio y de urea (Burg, 1995).

2. El fenómeno de la sal en la agricultura.

Todos los suelos contienen una mezcla de sales esenciales para el desarrollo de la vegetación. Cuando la concentración total de éstas es excesiva, el crecimiento vegetal se detiene. Este fenómeno se acentúa conforme aumenta la concentración de sales hasta que la planta muere (Kovda, 1980).

Los habitats salinos son aquellos que contienen un alto porcentaje de sales solubles; siendo el común denominador la salinidad del suelo y/o de la fuente de agua. La vegetación de estos habitats se designa halofita y, se distingue de la vegetación de habitats no salinos llamada glicofita (Stocker, 1926).

El grado de tolerancia a la sal tanto de las glicofitas como de las halofitas varia, por lo que es difícil establecer el parámetro que marque la división entre estos dos grupos (Chapman, 1960). Stocker (1926) menciona que una halofita es aquella planta que, en cualquier etapa de su vida, tolera una concentración crítica de sal (0.5% o aproximadamente 88 mM) que no es tolerada por una planta "normal" no halofita. Flowers y colaboradores (1977) proponen un valor crítico de NaCl de 300 mM. Esta definición implica que una halofita crecerá en un medio no salino tan bien como una glicofita, lo cual no siempre es cierto. Algunas halofitas no crecen en ausencia de NaCl, por ejemplo *Salicornia spp*, por lo que Sen y Rajpurohit (1978) proponen la siguiente clasificación:

- a) Halofitas verdaderas: son las plantas que crecen en condiciones salinas extremas, más de NaCl 1.5%.
- b) Halofitas facultativas: aquellas que crecen en condiciones salinas de NaCl de 0.5%.
- c) Halofitas de transición: crecen en las zonas de transición entre terrenos salinos y no salinos.
- d) Glicofitas: también llamadas plantas "normales" que solo toleran condiciones salinas por un corto periodo de tiempo.

El interés por las halofitas tiene dos aspectos: uno teórico, para entender su comportamiento y adaptación a este habitat (Flowers *et al.*, 1977), seguido de uno más aplicado para entender la respuesta y el metabolismo y, así, poder seleccionar o desarrollar plantas de cultivo que sean más tolerantes a la sal (Nieman y Shannon, 1976; Shannon, 1982).

2.1. Distribución y extensión global de los suelos afectados por sal.

Las regiones semiáridas ofrecen luz y temperaturas óptimas para la mayoría de los cultivos (en su mayoría glicofitas), pero la insuficiencia de lluvia hace necesaria la irrigación con agua que contiene sales disueltas y, al evaporarse ésta, las sales se concentran en el suelo. Este efecto acumulativo a través de décadas o siglos (dependiendo de la concentración de

sal, lluvia y permeabilidad del suelo) resulta en el deterioro de la tierra y en la incompatibilidad con la vida vegetal de interés económico (Batie y Healy, 1983).

Aproximadamente el 10% de la superficie de la tierra se compone de diferentes tipos de suelo afectados por salinidad. El cuadro 1 muestra la distribución de estos terrenos en el mundo (Kovda *et al.*, 1979):

Continente	Area (millones de hectáreas)
Norteamérica	15.7
México y Centroamérica	2.0
Sudamérica	129.2
África	80.5
Europa	50.8
Asia	676.6
Total	954.8

Cuadro 1. Distribución de los suelos afectados por salinidad.

La alta concentración de sales tiene influencia en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, así como en la fertilidad de éste (Szabolcs, 1989).

La salinización progresiva de los terrenos irrigados comprometen el futuro de la agricultura en las zonas más productivas del planeta (Ashraf, 1994; Serrano y Gaxiola, 1994). Los registros históricos muestran que hubo un cambio en la agricultura en la región del Tigris y del Eufrates de la antigua Mesopotamia (Jacobson y Adams, 1958). Dejaron de cultivar trigo por la cebada, la cual es más tolerante a la sal. La causa fue el drenaje pobre que provocó la salinización del terreno. Posteriormente, la cebada tampoco se pudo cultivar. Se considera que este hecho tuvo un papel importante en la caída de Mesopotamia (Downton, 1984).

A pesar de la experiencia adquirida, la salinización de las áreas irrigadas no ha disminuído, al contrario, sigue en aumento. Según la FAO (Organización de Agricultura y

Alimentación) y la UNESCO (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, Ciencia y Cultura), la mitad de los sistemas de irrigación existentes tienen problemas por salinidad. De acuerdo a las fuentes mencionadas anteriormente, diez millones de hectáreas de terrenos irrigados son abandonadas al año debido a los efectos adversos de la sal.

2.2. Soluciones al problema de la salinización.

Para enfrentar la creciente demanda de cultivos y productos vegetales, el empleo de técnicas de irrigación en la agricultura de todo el mundo ha aumentado en un 300% en los últimos 35 años (Kiyosue *et al.*, 1994). Esta irrigación de terrenos ha llevado a una disminución en la productividad, siendo la causa más frecuente la salinización. Para superar las limitaciones fisiológicas de los cultivos de interés comercial se pueden emplear básicamente tres herramientas: la ingeniería de suelos, la genética tradicional y la biología molecular.

En el pasado, los mayores esfuerzos para luchar contra la salinidad han sido dirigidos a prácticas de desalinización de tierras pero éstas tienen un alto costo, requieren del suministro de energía y son, sobre todo, imprácticas en países en vías de desarrollo. Lo anterior hace imperativo encontrar alternativas diferentes a las soluciones ingenieriles (Bray, 1993).

Las soluciones de tipo biológico radican en seleccionar y mejorar las especies de interés comercial que, en su mayoría, son glicofitas para que puedan crecer en condiciones de salinidad (Claes *et al.*, 1990).

Lo antes mencionado se puede realizar empleando la genética tradicional donde la variabilidad genética, relacionada a la tolerancia a sal, se observa como respuesta a la presión que ejerce la selección natural en los ambientes salinos (Piatkowski *et al.*, 1990). El mejoramiento genético por cruza no requiere del conocimiento básico de los mecanismos del fenómeno en consideración. Sólo utiliza plantas que tengan las características deseadas, para posteriormente transmitirles a la descendencia por medio de cruza (Yamaguchi *et al.*, 1992).

El otro tipo de solución biológica implica el mejoramiento de especies agrícolas (tolerancia a la sal) a través de modificaciones genéticas (Epstein, 1980; Haro *et al.*,

1993). Con la biotecnología, las posibilidades de obtener genotipos halotolerantes pueden lograrse por transformación genética utilizando la metodología del ADN recombinante. Sin embargo, la ingeniería genética requiere de un conocimiento básico del fenómeno para su manipulación. Genes relevantes necesitan ser seleccionados para posteriormente ser expresados en plantas transgénicas de interés comercial (Kiyosue *et al.*, 1994).

3. El estrés por sal.

Es un estrés de tipo abiótico como el provocado por un exceso de sales y por una deficiencia o exceso de agua, al igual que en el estrés de tipo calórico, la respuesta de los organismos puede estar muy conservada (Close y Lammers, 1993). En este caso, el cambio en la concentración de sales del medio externo produce una entrada o salida de agua a través de la membrana celular que funciona como una barrera para ciertos solutos, pero permite el libre paso del agua, promoviendo un equilibrio entre las concentraciones interna y externa; ésto produce un cambio inicial en el volúmen celular (Csonka, 1991).

El estrés salino tiene por una parte un efecto primario, el cual puede ser directo, como un daño de tipo tóxico, o un daño indirecto como las alteraciones de tipo metabólico y la inhibición del crecimiento y desarrollo. Por otra parte, un efecto secundario incluye deficiencia en la toma de nutrientes y, adicionalmente, un estrés de tipo osmótico (Csonka, 1989).

3.1. Estrés osmótico.

El estrés osmótico es una consecuencia de la presencia de organismos no adaptados en un medio en el que fluctúa la concentración de sales u otro tipo de moléculas osmóticamente activas; al aumentar las últimas en el medio externo se incrementa la osmolaridad con la consecuencia de una pérdida de la turgencia celular (Evans *et al.*, 1983; Close y Lammers, 1993).

En general, un organismo no puede modificar el medio externo por sí mismo, pero tiene dos posibles formas de hacerle frente: una es evitarlo, ya sea a través de la exclusión total o parcial mediante barreras físicas que lo aislen; al desaparecer el estrés, se elimina la

tensión ejercida. Por otra parte puede resistir al estrés tolerándolo, es decir, mantener un equilibrio con el estrés sin sufrir un daño o, como apunta Selye (1973), en un estado de resistencia. Un organismo que es tolerante al estrés es capaz de prevenir, disminuir o reparar el daño producido por la tensión ejercida por dicho estrés (Levitt, 1980; Evans *et al.*, 1983).

3.2. Osmoregulación.

La respuesta de los organismos de los diferentes reinos biológicos a cambios en la osmolaridad, presenta notables semejanzas, ya que la causa y el efecto son de naturaleza fisicoquímica, como la ósmosis en sí y la presión osmótica (Csonka, 1991).

La osmoregulación se define como la regulación del potencial osmótico interno de una célula por adición o eliminación de solutos en solución para hacer frente al estrés osmótico y evitar la deshidratación, hasta un punto en el que el potencial osmótico intracelular sea aproximadamente igual al potencial del medio que rodea a la célula (Heuer, 1994; Csonka, 1989; Evans *et al.*, 1983). La exposición de un organismo a un medio externo con alta osmolaridad resulta en la salida del agua interna. La disminución en el contenido de agua interna origina a su vez una disminución en la presión de turgencia y una contracción del volumen citoplasmático; una consecuencia de estos procesos es el aumento en la concentración de los metabolitos intracelulares y al mismo tiempo una reducción en la actividad del agua citoplasmática.

3.3. Participación de los iones como perturbadores en la función de las macromoléculas.

En la mayoría de las funciones bioquímicas de la célula se requiere de la participación de iones (Boyer, 1970). Sin embargo, el incremento de algunos iones en el medio intracelular puede ser tóxico al modificar o inhibir algunas funciones. Por ejemplo, las sales NaCl y KCl, así como sus productos iónicos, tienen un efecto deletéreo en la actividad enzimática de proteínas vegetales y animales, afectando de manera directa su función catalítica y su constante de afinidad por el sustrato o K_m (Yancey *et al.*, 1982).

3.4. Solutos compatibles u osmolitos protectores.

El organismo responde a un estrés de tipo osmótico incrementando la concentración de un número limitado de moléculas para restaurar algunas de las condiciones en que se encontraba en el estado de pre-estrés; estas moléculas no parecen inhibir los procesos celulares y se han denominado solutos compatibles (Brown y Simpson, 1972). Este término fue introducido por Brown y Simpson para describir a las sustancias no inhibitorias que se acumulan en el citoplasma de las células en un medio con una alta osmolaridad.

Entre los fenómenos que Yancey y colaboradores (1982) observan que se mantienen a lo largo de la escala filogenética está el de la concentración interna del ión potasio, la cual varía muy poco, independientemente de que los valores de presión osmótica ejercida se encuentren en intervalos amplios. La excepción es la arqueobacteria *Halobacterium salinarium* con valores de 4500 a 5000 nmol de K^+ / kg agua en un medio de NaCl 5.1 M (Yancey *et al.*, 1982).

Los solutos, denominados también osmolitos, muestran una sorprendente evolución convergente entre procariotes, plantas y animales, lo que sugiere que solo algunos tipos de solutos son compatibles con las macromoléculas biológicas.

La mayor parte de los osmolitos en eucariotes sometidos a un estrés de tipo hídrico están restringidos a algunas clases de productos metabólicos de bajo peso molecular: polioles como el glicerol, manitol y sorbitol; azúcares como la sacarosa y la trealosa y aminoácidos como el glutamato, prolina y betaina. Algunos animales también sintetizan urea y metilaminas como el N-óxido de trimetilamina (Yancey *et al.*, 1982).

Estos compuestos no son únicamente compatibles con las proteínas y con la estructura de la membrana, sino que también estabilizan estas estructuras cuando se enfrentan a condiciones adversas como la deshidratación, altas temperaturas o sustancias químicas nocivas. Por lo tanto, la síntesis de osmolitos se realiza en condiciones de estrés, independientemente del tipo que se trate.

Escherichia coli sintetiza dos osmolitos en respuesta al estrés osmótico: glutamato y trealosa (Csonka y Hanson, 1991). La acumulación de glutamato contribuye poco al ajuste osmótico y su papel fisiológico no ha sido explicado. Sin embargo, los mutantes para la

ruta biosintética de trealosa son sensibles a la osmolaridad del medio mínimo, lo que determina la importancia de este osmolito en condiciones de estrés salino (Glaever et al., 1988).

Los osmolitos que pueden ser tomados del medio externo, en vez de sintetizarlos, han sido llamados osmoprotectores (LeRedulier et al., 1984). En *E. coli* son la prolina y betaina; se ha observado la acumulación de estos compuestos bajo condiciones de estrés osmótico. Cuando estos osmoprotectores se encuentran presentes, la síntesis de osmolitos (glutamato y trealosa) no se realiza.

Los osmolitos mejor caracterizados en las plantas superiores son prolina, betaina y sacarosa. Aunque estos compuestos están presentes en el citoplasma y vacuola, las concentraciones de los dos primeros son mayores en el citoplasma pues dentro de la vacuola los iones orgánicos e inorgánicos aportan la concentración osmótica requerida (Leigh et al., 1981; McCue y Hanson, 1990). La prolina es el osmolito que se acumula en mayor cantidad en condiciones de estrés osmótico (Delauney y Verma, 1993; Larher et al., 1993) y ésta se puede sintetizar a partir de glutamato o de ornitina. El ácido abscísico también induce la acumulación de prolina (Finkelstein y Somerville, 1990). La prolina y betaina pueden actuar como osmoprotectores exógenos en algunos tejidos vegetales (Handa et al., 1986; Lone et al., 1987). La toma de éstos, estimulada por el estrés osmótico, inhibe la síntesis endógena (Lone et al., 1987). El papel fisiológico de la síntesis de osmolitos en plantas ha sido demostrado por el aumento en la tolerancia al estrés osmótico presente en mutantes con una capacidad de síntesis incrementada (Larher et al., 1993).

3.5. Toxicidad osmótica contra toxicidad iónica específica

La salinidad tiene dos posibles efectos tóxicos sobre las células: el efecto osmótico no específico y la toxicidad específica de iones sobre sistemas celulares definidos. Al confrontarse con esta amenaza, los organismos desarrollan defensas basadas en el ajuste osmótico, sistemas de transporte iónico y proteínas de estrés (Serrano, 1994).

En las bacterias *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, el mayor componente de la toxicidad por sal es el efecto osmótico del NaCl. Esto se demostró porque: (1) las concentraciones isoosmóticas de sacarosa y NaCl tienen los mismos efectos inhibitorios

(Csonka, 1981); (2) la tolerancia a sal aumenta cuando la célula toma prolina del medio externo o aumenta el metabolismo de este osmolito en cepas mutantes (Csonka, 1981; Csonka y Hanson, 1991); y (3) las cepas mutantes con capacidad incrementada para transportar sodio no presentan tolerancia a sal (Carmel *et al.*, 1994). Por lo tanto, en condiciones normales, el ajuste osmótico limita la tolerancia a sal. Lo anterior no significa que la toxicidad del sodio no sea relevante. Más bien, en estas bacterias la capacidad de ajuste osmótico es menor que la capacidad para eliminar al sodio (Schuldiner y Padan, 1993).

Si crecemos a la levadura *S. cerevisiae* en un medio con glucosa, el NaCl es más tóxico que concentraciones osmóticamente equivalentes de KCl o sorbitol (Gaxiola *et al.*, 1992; Gläser *et al.*, 1993). Por lo tanto, la toxicidad por sodio es el mayor componente del problema provocado por salinidad. La situación es diferente cuando el medio contiene otras fuentes de carbono, como galactosa. En este caso el NaCl, el KCl y el sorbitol presentan toxicidades similares. Aparentemente, cuando la fuente de carbono es glucosa, el ajuste osmótico es más activo que la eliminación del sodio, mientras que en los otros medios observamos lo opuesto. El metabolismo de la glucosa en *S. cerevisiae* es muy activo, lo cual resulta en una síntesis óptima del osmolito glicerol. En otras levaduras y hongos, la velocidad del metabolismo de glucosa es menor (Gancedo y Serrano, 1989), por lo cual el ajuste osmótico debido a la conversión de glucosa en glicerol limita la tolerancia a sal, aún en medios adicionados de glucosa (Beever y Laracy, 1986).

La situación en plantas no está clara. Algunos estudios (Munns y Termaat, 1986) indican que la toxicidad por NaCl, y no el estrés osmótico, es responsable de los efectos inhibitorios de la sal en las plántulas de trigo. Estos resultados se obtuvieron al comparar el crecimiento en un medio adicionado con sal y en una solución de nutrientes (6X) osmóticamente equivalente a NaCl 0.1 M. En un inicio, el crecimiento de la raíz se detiene debido a la disminución del suministro de agua causado por el efecto osmótico no específico de la sal (Yeo *et al.*, 1991). En este caso, concentraciones osmóticamente equivalentes de NaCl y de manitol presentaron los mismos efectos inhibitorios. Después de varias horas, el ajuste osmótico se lleva a cabo, el suministro de agua se restaura y el crecimiento de la raíz continúa a una menor velocidad que la del grupo control. A largo plazo (días y semanas), los efectos de la sal no son debidos al déficit de agua pues la turgencia de las células de las plantas estresadas es similar o mayor a la de las plantas control (Munns, 1993). En la primera fase del ajuste osmótico, el manitol es más tóxico que el NaCl debido a que el primero no puede ser incorporado al interior de las células y,

por ello, no contribuye al ajuste. En la fase no osmótica, la inhibición del crecimiento de la raíz puede ser explicada por las señales hormonales emitidas de la raíz al resto de la planta (Munns, 1993). El estrés hídrico provoca una disminución en las citocinas y un aumento en el ácido abscísico (Lerner y Amzallag, 1994). Por lo tanto, es difícil evaluar el papel de la toxicidad por iones en plantas.

El mecanismo primario de la toxicidad por sal en plantas permanece oscuro. En algunos casos particulares, como el de *Citrus sinensis* (Bañuls y Primo-Millo, 1992) y la soya (Abel, 1969), el ión cloruro es el responsable de la toxicidad pues tanto el NaCl como el KCl presentan los mismos efectos inhibitorios y el NaNO₃ es menos tóxico. En el jitomate (Rush y Epstein, 1981), el trigo (Gorham *et al.*, 1990) y en *A. thaliana* (Sheahan *et al.*, 1993) el NaCl es más tóxico que el KCl apuntando a la toxicidad específica por sodio. Estudios en células de tabaco en suspensión indican que concentraciones osmóticamente equivalentes de sorbitol y manitol son menos inhibitorias que el efecto del NaCl. Sin embargo, el KCl es más tóxico que el NaCl (La Rosa *et al.*, 1985). Lo mismo es observado en las plantas halófilas (Rush y Epstein, 1981), y la toxicidad del KCl se puede deber a una toma mayor del ión cloruro del KCl que del NaCl.

El estrés salino provoca deficiencias en el potasio y calcio intracelular y este efecto es disminuido al adicionar altas concentraciones de Ca²⁺ al medio externo (10 mM). En las plantas, concentraciones elevadas de calcio extracelular no sólo mantienen al Ca²⁺ intracelular, si no también al K⁺, y reducen la entrada de Na⁺ a la célula. Estos efectos se llevan a cabo por interacciones complejas entre los cationes y sus sistemas de transporte (Epstein *et al.*, 1963; Epstein y Rains, 1965; Rains y Epstein, 1967). El calcio también reduce la toma del Cl⁻ en *Citrus sinensis*.

La conclusión que se obtiene de este análisis es que la capacidad de ajuste osmótico y de transporte de iones en diferentes organismos está balanceada. También se observa que alguno de estos procesos es más activo en algunos organismos bajo ciertas condiciones. Por lo tanto, para aumentar la tolerancia a sal en plantas de interés comercial, en principio se necesitaría manipular simultáneamente el ajuste osmótico y el transporte de iones.

El mayor problema para la comprensión de la toxicidad por sal radica en la falta de información sobre los mecanismos moleculares y en la relevancia fisiológica de los diferentes blancos y las respuestas de defensa. La mayoría de los datos que se han obtenido en la investigación de la tolerancia a sal describen el fenómeno que se produce

sin identificar la relación causa-efecto (Nguyen y Joshi, 1994). Este tipo de investigación ha sido descrita como "fenomenológica" (Serrano y Gaxiola, 1994).

El análisis genético de la tolerancia a sal requiere del aislamiento de mutantes que presenten un aumento o disminución de tal fenómeno. Los genes responsables deben ser aislados. Este análisis es posible en aquellos modelos experimentales donde los mutantes puedan ser fácilmente seleccionados y los genes afectados sean aislados. Las plantas de interés comercial no pertenecen a estos convenientes sistemas experimentales.

4. Funciones celulares sensibles a la sal.

Bajas concentraciones de NaCl (50-150 mM) tienen efectos positivos sobre las enzimas debido a los efectos electrostáticos que ocurren en la estructura proteica. Lo anterior corresponde a la fuerza iónica del citoplasma; las enzimas citoplasmáticas se han adaptado a estas condiciones y es ahí donde presentan una función óptima (Wyn Jones y Pollard, 1983).

Las concentraciones elevadas de sal (mayores a 300-500 mM) inhiben a la mayoría de las enzimas pues el NaCl altera el equilibrio hidrofóbico-electrostático de las fuerzas que mantienen la estructura proteica (Wyn Jones y Pollard, 1983). Una fuerza iónica elevada incrementa las fuerzas hidrofóbicas (efecto *salting-out*) y disminuye las fuerzas electrostáticas (efecto *screening*). Las altas concentraciones de algunos aniones ($\text{SCN}^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^- > \text{SO}_4^{2-}$) y de algunos cationes ($\text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+} > \text{Li}^+ > \text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+$) rompen la estructura del agua y, con ello, disminuyen las interacciones hidrofóbicas (efecto *salting-in*) (Wyn Jones y Pollard, 1983). Con el NaCl, el efecto *salting-out* se debe principalmente a la fuerza iónica.

La sensibilidad de cada enzima a los efectos provocados por la sal varía; la mayoría de las reacciones metabólicas son inhibidas con concentraciones de sal mayores a 300-500 mM (Yancey *et al.*, 1982; Gimmler *et al.*, 1984). Además, la función de la membrana se ve afectada debido a cambios estructurales en las proteínas de membrana. La tolerancia a sal debe involucrar la eliminación del NaCl del citoplasma así como el ajuste osmótico realizado por solutos orgánicos compatibles u osmolitos.

Las arqueobacterias halófilas presentan sustituciones en aminoácidos que forman proteínas únicas con función óptima en altas concentraciones de sal. La diferencia principal entre las proteínas de arqueobacterias y las de los demás organismos radica en la elevada proporción de aminoácidos con carga y la pequeña proporción de aminoácidos hidrofóbicos grandes presentes en las primeras (Yancey *et al.*, 1982; Brown, 1990). De esta manera, el equilibrio entre las interacciones hidrofóbicas y electrostáticas en las proteínas ocurre en concentraciones elevadas de sal. Esta estrategia no ha sido exitosa en el transcurso de la evolución, probablemente porque carece de la flexibilidad que ofrecen las combinaciones de proteínas "normales" y la síntesis de osmolitos durante el estrés osmótico. Las arqueobacterias halófilas están restringidas a ciertos nichos ecológicos con altas concentraciones de sal y no pueden sobrevivir en condiciones normales.

Además de los efectos no específicos provocados por la sal, algunos sistemas enzimáticos pueden ser especialmente sensibles a la inhibición por el ión sodio o por el cloruro a menores concentraciones, causados por interacciones específicas de éstos con sitios de unión inhibitorios. Si estas enzimas sensibles al NaCl catalizan reacciones metabólicas importantes y sus niveles de actividad no llenan los requerimientos metabólicos, se dice que son blancos primarios en la toxicidad por sal, determinando la sensibilidad de los organismos al estrés salino. La identificación de estos blancos es de vital importancia para la comprensión de daño causado por el NaCl y para la manipulación de la tolerancia a sal. La síntesis de proteínas se ha considerado como un posible blanco de la toxicidad por sal porque este proceso *in vitro* requiere de K^+ (100-150 mM) y es inhibido por concentraciones de Na^+ y Cl^- mayores a 100 mM (Wyn Jones y Pollard, 1983). El sodio puede interferir con el potasio en diferentes sitios de unión a proteínas y al ARN, mientras que el cloro puede interferir con sitios aniónicos involucrados en la unión del ARN. La fosfoenolpiruvato carboxilasa, la glutatión reductasa y la ribulosa-bifosfato carboxilasa son enzimas que requieren de sustratos aniónicos y, por lo tanto, son sensibles a la inhibición por Cl^- (Gimmler *et al.*, 1984). La inhibición por sodio se puede esperar en el caso de enzimas activadas por potasio como la piruvato cinasa, fosfofructo cinasa y ADPG-almidón sintetasa (Wyn Jones y Pollard, 1983). Esta información aún no ha sido comprobada.

5. *Saccharomyces cerevisiae* como modelo de laboratorio.

El análisis molecular de la tolerancia a sal puede ser investigado en organismos modelo y la información obtenida podría extrapolarse a las plantas de interés comercial. De este modo se podrán diseñar estrategias biotecnológicas para incrementar la tolerancia a sal en plantas transgénicas.

Este tipo de análisis ya se ha iniciado con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, uno de los modelos más poderosos para la biología molecular de las células eucariotas (Serrano y Gaxiola, 1994). La bacteria *Escherichia coli* ha sido ampliamente estudiada en relación a este fenómeno, pero al ser un procarionte es difícil extrapolar la información obtenida a células vegetales (Csonka y Hanson, 1991). La pequeña planta *Arabidopsis thaliana* está alcanzando el nivel de modelo experimental pero el inconveniente que presenta es que el aislamiento de los genes mutados presenta dificultades considerables (Meyerowitz, 1989).

El conocimiento del estrés y las respuestas generadas hacia éste son cruciales para entender como un sola célula y los organismos multicelulares se adaptan a los cambios ambientales y a las condiciones fisiológicas. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es el eucariote mejor caracterizado genética y bioquímicamente; es fácil de manipular genéticamente a través de mutantes, genes reporteros, etc. y, fisiológicamente, se puede controlar su crecimiento y otras condiciones ambientales; además tiene un tiempo de generación relativamente rápido.

Saccharomyces cerevisiae es un eucariote simple que posee muchas de las características moleculares de las células eucariotas superiores, lo que lo hacen un excelente sistema modelo para el estudio del estrés producido por sal. Su material genético se encuentra en el núcleo en forma de cromatina, se organiza en 16 cromosomas, los cuales poseen un centrómero, dos telómeros y múltiples sitios, en los cuales se inicia la replicación del ácido desoxirribonucleico (ADN). Las células de levadura también contienen proteínas eucariotas características (histonas, actinas, tubulinas), así como también organelos especializados, lo que implica la compartimentalización de moléculas y enzimas. El ciclo de vida presenta tres tipos de células diferentes; existen dos tipos de células haploides, designadas células a y células α ; al fusionarse forman el tercer tipo de célula, diploide a/α . Por otra parte, el contenido de ADN de levadura es de 15,000 kb (Lauer *et al.*, 1977), es decir, sólo 4 veces más que el de la enterobacteria *E. coli* (Petes, 1980). Todas estas características han

contribuido a que durante los últimos 40 años esta levadura haya emergido como un poderoso modelo para estudios bioquímicos y genéticos de eucariotes.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* comparte con las plantas los mecanismos de transporte iónico (Serrano, 1985) y estos genes se pueden aislar fácilmente por complementación (Struhl, 1983). Además los plásmidos multicopia permiten la selección de genes específicos sobreexpresados que incrementan la tolerancia a sal (Rine *et al.*, 1983).

Lo anterior se pone de manifiesto con el trabajo de Gaxiola y colaboradores (1992), quienes aislaron genes halotolerantes de levadura denominados *HAL1*, *HAL2* y *HAL3* (Gaxiola *et al.*, 1992; Gläser *et al.*, 1993; Ferrando *et al.*, 1995). *HAL1* y *HAL3* influyen las concentraciones intracelulares de sodio y potasio y, por lo tanto, son parte del sistema que regula la homeostasis iónica. El producto de *HAL2* es una enzima que participa en la biosíntesis de metionina y, además, funciona como nucleotidasa catalizando la asimilación de fosfato. Esta proteína muestra similitud con las inositol fosfatasas, las cuales son inhibidas por sales (Gläser *et al.*, 1993).

En levadura, Anderson y colaboradores han aislado el gen *KAT1*, el cual codifica para una proteína que transporta potasio en vegetales (Anderson *et al.*, 1992). Por otra parte, la exclusión de sodio del medio intracelular parece conferir una mayor tolerancia al estrés por NaCl tanto en levaduras como en plantas superiores. La anterior se deriva de los trabajos de Haro y colaboradores (1993), quienes también proponen a *S. cerevisiae* como un modelo para estudiar los fenómenos de tolerancia a sal en vegetales.

6. *Saccharomyces cerevisiae* en condiciones de estrés salino.

Esta levadura acumula principalmente glicerol como osmolito durante el estrés osmótico, aunque la trealosa también está involucrada en el ajuste osmótico y en la protección al estrés (Blomberg y Adler, 1992).

Las concentraciones intracelulares de trealosa (máximo 400 mM) son menores que la del glicerol, el cual puede alcanzar hasta 2 M. Por lo tanto, la acumulación de glicerol es la principal causa responsable del ajuste osmótico en *S. cerevisiae* (Blomberg y Adler,

1992). Esta levadura continuamente produce glicerol a partir de glucosa (Gancedo y Serrano, 1989). La síntesis de biomasa a partir de carbohidratos reduce el NAD^+ a NADH y la producción de glicerol regenera el NAD^+ en condiciones anaerobias. La mayor parte del glicerol asociado al crecimiento sale al medio externo. El incremento en la acumulación de glicerol durante el estrés osmótico se debe al aumento en el anabolismo de este compuesto y a su retención dentro de las células (Blomberg y Adler, 1989). El glicerol también es una fuente de carbono y su ciclo metabólico de síntesis y degradación se muestra en la figura 1.

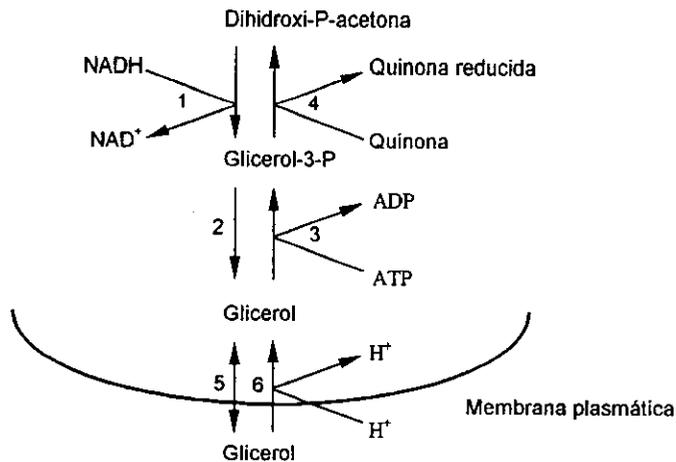


Figura 1. El ciclo metabólico del glicerol en levaduras. Enzimas: 1, glicerol-3-P-deshidrogenasa; 2, glicerol-3-P-fosfatasa; 3, glicerol cinasa; 4, glicerol-3-P-deshidrogenasa mitocondrial; 5, transporte pasivo; 6, transporte activo.

Parece que *S. cerevisiae* únicamente presenta transporte pasivo para el glicerol (Gancedo y Serrano, 1989), pero otras levaduras como *Debaryomyces hansenii* (Lucas *et al.*, 1990), *Zygosaccharomyces rouxii* (van Zyl *et al.*, 1990) y *Pichia sorbitophila* (Lages y Lucas, 1995) tienen transporte activo, probablemente mediado por un transporte de protones.

La enzima crucial en la síntesis de glicerol es la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. El gen correspondiente, *GPDI*, se induce con estrés osmótico y las mutaciones que lo inactivan provocan osmosensibilidad (Larsson *et al.*, 1993; Albertyn *et al.*, 1994).

Aunque el glicerol es el poliol predominante en la respuesta al estrés osmótico en hongos, otros polioles como el eritritol, arabitol, manitol y sorbitol pueden contribuir al ajuste osmótico (Blomerg y Adler, 1992).

6.1. Transporte iónico en la membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*

6.1.1. Inclusión de sodio y potasio.

Se han identificado en esta levadura los principales sistemas de transporte iónico que operan en la membrana plasmática (Serrano, 1991; Gaber, 1992). Una H^+ -ATPasa de la membrana plasmática codificada en el gene *PMA1* genera un gradiente electroquímico de protones que regula el pH y que induce a los sistemas de transporte secundario que catalizan la toma de nutrientes.

Dos genes homólogos, *TRK1* y *TRK2*, parecen ser los responsables de la toma de alta afinidad para potasio, lo que permite un crecimiento óptimo a una concentración de K^+ 0.2 mM. En los mutantes *trk1/trk2*, una ruta no identificada para la toma de K^+ de baja afinidad permite el crecimiento en medios con potasio 100 mM (Ko y Gaber, 1991). *TRK2* es funcionalmente homólogo a *TRK1* pero su expresión es menor en condiciones normales (Ramos *et al.*, 1994). Por lo tanto, *TRK1* es el sistema principal de alta afinidad en la inclusión de potasio en *S. cerevisiae* (Ko y Gaber, 1991). Las proteínas TRK no presentan similitud en las bases de datos y nunca se ha demostrado que sean transportadoras. Se ha propuesto que son componentes de un sistema de toma de K^+ formado por varias subunidades; su papel es modular la afinidad del transportador en respuesta a la pérdida del potasio intracelular y al estrés salino (Ramos, *et al.*, 1994). En un medio con bajas concentraciones de K^+ y altas concentraciones de NaCl, el sistema TRK experimenta un incremento en la afinidad por K^+ y Rb^+ pero no para Na^+ y Li^+ . Este mecanismo no se conoce, pero la discriminación entre K^+ (Rb^+) y Na^+ (Li^+) aumenta dramáticamente.

El papel de los sistemas de inclusión de cationes en la tolerancia a sal ha sido demostrado con estudios en mutantes. En la levadura *S. cerevisiae*, células *trk1* presentan una menor discriminación entre K^+ y Na^+ que las células *TRK1* (Haro *et al.*, 1993). Aparentemente, el sistema TRK posee una mayor especificidad hacia el K^+ , comparándolo con el sistema de toma de cationes de baja eficiencia que opera en las células *trk*.

Han sido identificados dos genes de levadura, *HAL1* (Gaxiola *et al.*, 1992) y *HAL3* (Ferrando *et al.*, 1995) cuya sobreexpresión aumenta la discriminación K^+/Na^+ y la tolerancia a sal. Ambos codifican para proteínas solubles sin similitud en los bancos de datos y pueden dar cabida a nuevos mecanismos de regulación en la homeostasis iónica. Aunque sus efectos son parcialmente mediados por la bomba de sodio, es importante mencionar que estos dos genes aumentan la inclusión de potasio en condiciones de estrés salino.

6.1.2. Exclusión de sodio.

Para identificar los sistemas de eliminación de sodio en levadura se han llevado a cabo dos diferentes estrategias. En *S. cerevisiae*, la hipersensibilidad a sodio y litio de una cepa silvestre se complementó con un biblioteca genómica obtenida de una cepa con tolerancia normal a estos cationes (Haro *et al.*, 1991). Una clona que contenía al gen *PRM2* (Rudolph *et al.*, 1989), descrito anteriormente, confería tolerancia a Li^+ y Na^+ al aumentar la exclusión de estos cationes. Además, la disrupción de este gen resultaba en la disminución del flujo de Li^+ y Na^+ y en hipersensibilidad a estos cationes. En un inicio se propuso que el producto del gen *PRM2* era una ATPasa que transportaba Ca^{2+} , por su similitud con las ATPasas para calcio presentes en la membrana citoplasmática de animales (Rudolph *et al.*, 1989). Aunque no se han reportado estudios bioquímicos, probablemente corresponde a una ATPasa que bombea sodio y el gen se ha renombrado *ENAI*. Este es el primero de cuatro genes homólogos dispuestos en tandem. La función de los otros tres genes se desconoce. *ENAI* es el que se expresa más y se piensa que es el principal responsable de la tolerancia a sal (Garcia-deblas *et al.*, 1993).

En la segunda estrategia se generaron mutantes de *Schizosaccharomyces pombe* con nitroguanidina y se aislaron los que presentaban un incremento en la tolerancia a litio.

Estos mutantes muestran un aumento en el flujo de Li^+ y Na^+ y contienen un locus amplificado (*sod2*) que probablemente codifica para un antiporte H^+ - Na^+ , con similitud a antiportes bacterianos y animales (Jia *et al.*, 1992).

La disrupción de *sod2* resulta en sensibilidad a sal. No está claro porque dos levaduras relacionadas (*S. cerevisiae* y *S. pombe*) tienen mecanismos diferentes para la exclusión de sodio. Se requiere de más información sobre la distribución de ATPasas para sodio y de los antiportes H^+ - Na^+ en diferentes hongos.

En *S. cerevisiae*, *ENA1* es determinante en la tolerancia a sal (Haro *et al.*, 1993). La expresión de este gen se induce por estrés osmótico, depleción de nutrientes y pH elevado (Garcia-deblas *et al.*, 1993). El nivel de expresión de *ENA1*, tanto en condiciones basales como inducidas, depende específicamente de una fosfatasa llamada calcineurina (Mendoza *et al.*, 1994). Esto explica lo que ocurre cuando se inactiva el gen de la calcineurina: se reduce la exclusión de sodio y la tolerancia a sal (Nakamura *et al.*, 1993).

El producto del gen *HAL3* también ha mostrado influenciar la expresión de *ENA1* (Ferrando *et al.*, 1995). La sobreexpresión de *HAL3* incrementa la tolerancia a sal y la expresión de *ENA1*. *HAL3* codifica para una proteína plasmática de función desconocida.

La conclusión que se obtiene de estos estudios es que además de los transportadores de iones, las proteínas que regulan la expresión de los genes de estos transportadores poseen un gran valor biotecnológico.

6.1.3. Transporte de cloruro.

Las células bacterianas y de levadura no requieren cloruro para su crecimiento y exhiben una baja permeabilidad hacia este anión (Rothstein, 1964). Sin embargo, las plantas presentan un requerimiento de Cl^- como micronutriente esencial para la fotosíntesis y también utilizan este anión para el ajuste osmótico dentro de la vacuola (Leigh y Wyn Jones, 1985).

Desafortunadamente, las bases moleculares para los transportadores de cloruro se desconocen y no es posible evaluar si la manipulación de éstos puede modificar la tolerancia a sal.

6.1.4. H⁺-ATPasa de la membrana plasmática.

Las principales ATPasas de membrana en hongos y plantas son enzimas homólogas que operan como bombas de protones electrogénicas. El gradiente electroquímico de protones que generan estas ATPasas promueven el transporte activo secundario de diferentes moléculas mediante un cotransporte de protones (Serrano, 1989).

En la levadura *S. cerevisiae*, la tolerancia a sal en mutantes con expresión reducida de la H⁺-ATPasa es similar a la de las células silvestres (Vallejo y Serrano, 1989). El nivel de expresión de la H⁺-ATPasa no aumenta en condiciones de estrés salino (Serrano, 1996). Por lo tanto, la ATPasa no parece ser uno de los factores que limiten la tolerancia a sal en este organismo. De hecho, mutantes de *S. cerevisiae* y de *S. pombe* con actividad reducida de la H⁺-ATPasa muestran un incremento en la tolerancia a altas concentraciones de NaCl (2.5 M), altas concentraciones de etanol (12.5%) y al choque térmico (25-48° C). Por lo tanto, un exceso de actividad de esta enzima puede promover el efecto contrario al deseado (Panaretou y Piper, 1990).

La situación es diferente para *Zygosaccharomyces rouxii*, donde el NaCl aumenta la expresión de la H⁺-ATPasa (Watanabe *et al.*, 1993). Se piensa que esta enzima es inducida por la sal cuando el Na⁺ es eliminado mediante el antiporte H⁺-Na⁺ pero no cuando la Na⁺-ATPasa se encuentra activa. En el último caso, el NaCl induce al gen de la Na⁺-ATPasa y la H⁺-ATPasa tendría poca relevancia en la tolerancia a sal.

6.1.5. Vacuola.

Se seleccionaron mutantes de *S. cerevisiae* con defectos en la biogénesis vacuolar que eran osmosensibles y mutantes que presentaban incapacidad para crecer en altas concentraciones osmóticas, con defectos en la biogénesis vacuolar y que secretaban proteínas vacuolares al periplasma (Latterich y Watson, 1991). Una posible interpretación de estos resultados es que ciertas funciones que se requieren para la biogénesis vacuolar

también son necesarias para la osmoregulación. La vacuola misma puede estar involucrada en la osmoregulación como una fuente de agua durante el estrés osmótico en el citoplasma. Los mutantes que presentan vacuolas disminuidas o inexistentes pierden viabilidad cuando se les enfrenta al estrés osmótico (Latterich y Watson, 1993). El flujo de agua desde la vacuola hacia el citoplasma puede ser un factor importante durante la respuesta inicial al estrés osmótico (Mager y Varela, 1993).

6.2. Transducción de la señal.

En levaduras se desconocen los mecanismos por los cuales las condiciones de estrés osmótico se perciben y cómo esta señal se traduce generando el ajuste en la expresión génica. Estas células podrían ser capaces de percibir altas concentraciones osmolares a nivel de membrana y transmitir la señal mediante modificaciones postranscripcionales. Se piensa que una de estas proteínas fuese la ATPasa de membrana involucrada en el transporte de protones cuya función consiste en mantener el pH intracelular (Serrano *et al.*, 1986).

La existencia de canales mecanosensibles a iones en la membrana plasmática de levadura (Gustin *et al.*, 1988) sugiere que éstas son capaces de percibir y responder a fuerzas físicas como lo es la presión osmótica. Estos canales permiten el paso de cationes y aniones, son activados por y se adaptan al estiramiento de la membrana y, con ello, pueden contribuir a la regulación del turgor celular (Gustin *et al.*, 1988).

Con los antecedentes mencionados se supone que un incremento en la osmolaridad externa es percibido en la membrana plasmática. Como consecuencia de la alteración de los gradientes iónicos (Na^+ , K^+ , H^+ , etc.) y de la pérdida de presión de turgencia son desencadenados una serie de complejos eventos moleculares, posiblemente involucrando una cascada de proteínas con actividad de cinasas que conlleva a la modificación de las actividades enzimáticas y a cambios en la expresión génica. Parte de esta expresión inducida puede ser para los procesos de protección y recuperación como lo son la síntesis de trealosa. También se producen osmolitos, principalmente glicerol, para restaurar la presión de turgencia.

Otra hipótesis propuesta recientemente (Brewster *et al.*, 1993) postula que existe un componente de la pared celular que actúa como ligando para un receptor de la membrana

plasmática. Una caída en la presión de turgencia causa alteración en la interacción ligando-receptor, desencadenando una señal de transmisión. Los rápidos avances en este campo justifican la idea de que los principales procesos que perciben y regulan el estrés osmótico serán elucidados en un futuro cercano.

III

HIPÓTESIS

En el genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se encuentran secuencias de ADN, aún no identificadas, que participan en la tolerancia a cloruro de sodio, ya sea por su efecto sobre el componente osmótico de la sal y/o sobre la toxicidad generada por los iones que la componen.

IV

OBJETIVOS

Objetivo general:

Clonar secuencias de ADN del genoma de la levadura que, cuando están presentes en un plásmido unicopia, contribuyan a la tolerancia al estrés por sal en este organismo.

Objetivos particulares:

Transformar células de *Saccharomyces cerevisiae* con una biblioteca genómica contenida en un plásmido unicopia y seleccionar a las transformantes en medio selectivo con una concentración elevada de NaCl (1.5 M).

Aislar y caracterizar, por medio de un mapa de restricción, la secuencia halotolerante.

Determinar la secuencia del ADN de levadura aislado (secuenciación) y su localización dentro del genoma de este organismo eucariote.

Establecer un estudio preliminar, con los resultados obtenidos y con la búsqueda bibliográfica, sobre la posible participación de la secuencia aislada en el fenómeno de la tolerancia a cloruro de sodio.

V

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Material Biológico.

Se utilizaron los siguientes microorganismos:

Saccharomyces cerevisiae cepa RS16(a) (Eraso *et al.*, 1987; MATa, leu2-3, 112, ura3-251.328.372), la cual se mantiene almacenada en cajas de Petri con medio YPD sólido a 4 °C.

Escherichia coli cepa HB101 (Boyer y Roulland-Dussoix, 1969), la cual se mantiene almacenada en cajas de Petri con medio Luria (Miller, 1972) sólido a 4 °C.

2. Transformación de levadura con la biblioteca genómica.

Se realizó la transformación de *S. cerevisiae* según el método de Elble (1992) con la biblioteca genómica donada por el Dr. D. Botstein (Rose *et al.*, 1987).

2.1. Biblioteca genómica.

Se han construido varios bancos genómicos que utilizan vectores para levadura basados en el elemento *ARS* (Autonomously Replicating Sequence) (Nasmyth y Reed, 1980). Estos bancos tienen varias limitaciones. La primera radica en que estos plásmidos son multicopia, lo cual puede impedir el aislamiento de genes tóxicos para levadura cuando el vector se presenta en más de dos copias por célula. La segunda limitante es que estos vectores son relativamente inestables en levadura. Por lo tanto, cualquier mezcla de células transformantes contiene un número variable de plásmidos por célula. La mayoría de ellas pueden haber perdido el vector; esta distribución no uniforme, dificulta el análisis del fenotipo.

Los plásmidos que contienen centrómero son unicopia (1 o 2 plásmidos por célula) y mitóticamente estables, menos del 1% de pérdida por célula por generación (Clarke y Carbon, 1980).

En ausencia de presión selectiva, la frecuencia de la segregación mitótica de los vectores con centrómero presenta una variación inversamente proporcional al tamaño del plásmido (Hieter et al., 1985). Por lo tanto, los plásmidos que contienen insertos mayores son más estables (1-6% de pérdida en 30 generaciones) en levadura que aquellos sin inserto (50% de pérdida en 30 generaciones).

Por lo mencionado anteriormente, un banco genómico que utiliza al plásmido YCp50 como vector supera varias de las limitaciones asociadas a aquellos que se presentan en multicopia.

El plásmido YCp50 (*URA3*, que complementa la auxotrofia para uracilo de la cepa RS16(a)), fue construido por M. Johnston y R. W. Davis y se muestra en la figura 2.

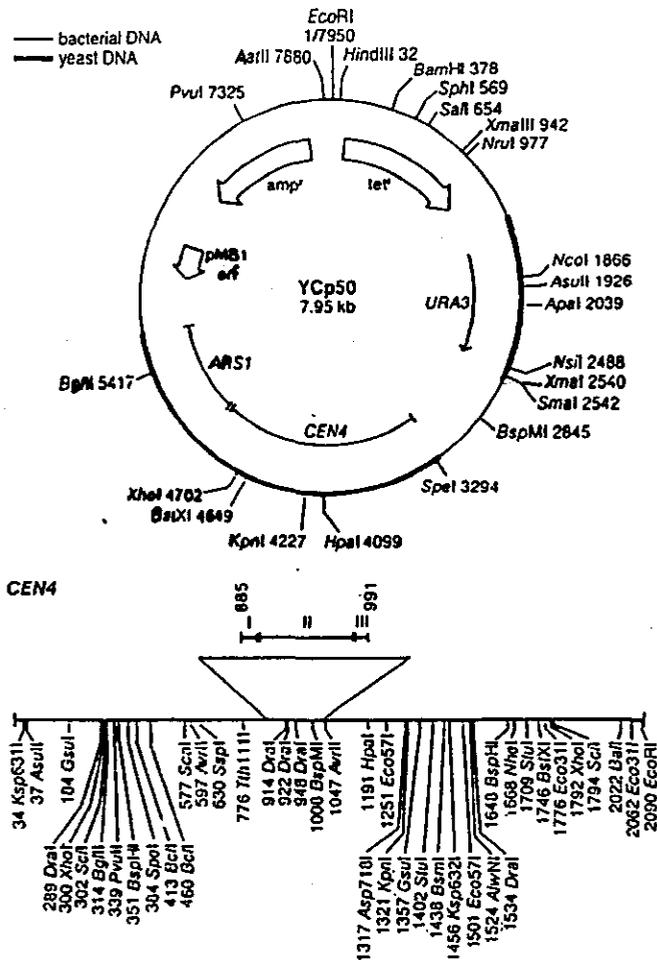


Figura 2. Mapa de restricción del vector YCp50. El número lateral indica la primera base nitrogenada que reconoce la endonucleasa correspondiente.

2.1.1. Construcción del banco genómico.

Se hizo una restricción parcial del ADN total de levadura con la enzima *Sau3A*.

Mediante un gradiente de sacarosa (Maniatis *et al.*, 1982), se separaron los fragmentos de ADN con longitudes en el rango de: 10-15 kb, 15-20 kb y 20-30 kb.

El vector YCp50 se cortó con Bam HI, se trato con fosfatasa y se mezcló en una relación 2:1 (en peso) con el ADN de levadura fraccionado. Los fragmentos de 10-15 kb se ligaron en una concentración de 30 µg/ml de ADN total (incluyendo al vector), los de 15-20 kb en concentración de 22.5 µg/ml y los de 20-30 kb en 15 µg/ml.

2.2. Transformación de levadura (Elble, 1992).

Se colocaron 10 ml de medio YPD en un matraz Erlenmeyer con capacidad de 125 ml, los cuales fueron inoculados con una población inicial de por lo menos 3×10^4 células/ml calculadas a partir de datos obtenidos en el espectrofotómetro (Pharmacia LKB-Ultrospec III).

Se incubó en un agitador "Incubator Shaker" (New Brunswick Scientific Co., E.U.A.) durante la noche (18 horas) con agitación constante de 250 rpm y temperatura de 30 °C. El tiempo de generación de *S. cerevisiae* en este medio de cultivo, bajo las condiciones mencionadas, es de 60 a 90 minutos

Medio YPD:

extracto de levadura	10 g/L
peptona	20 g/L
glucosa	20 g/L

2.2.1. Cosecha de células de levadura.

Para cosechar a *S. cerevisiae* se transfirieron las células a tubos Falcon estériles con capacidad de 15 ml. Se centrifugaron a 3,000 rpm en centrífuga clínica (Beckman GPR (E.U.A.)) durante 10 min a temperatura ambiente y se decantó el sobrenadante.

2.2.2. Transformación.

El botón celular se resuspende y se lava con 1 ml de agua estéril. Se centrifuga bajo las condiciones mencionadas anteriormente, el sobrenadante se decanta y las células se resuspenden en el líquido remanente.

Las células se transfieren mediante una micropipeta a tubos Eppendorf estériles con capacidad de 1.5 ml. Se agregan 10 μ l de ADN de esperma de salmón (10 μ g/ μ l) y se adiciona 1 μ l de la biblioteca genómica (1 μ g/ μ l). Se mezcla en un vortex (K-550 Vortex-Genie) durante 20 segundos. Se preparan 0.5 ml de solución PLATE que se adicionan al tubo Eppendorf y se mezcla en el vortex durante 20 segundos.

Solución PLATE:

PEG 4000 al 45% estéril.....	9 ml
acetato de litio 1 M.....	1 ml
Tris-HCl 1 M pH 7.5.....	100 μ l
EDTA 0.5 M.....	20 μ l

La mezcla anterior se incuba durante la noche a temperatura ambiente. Se toman 50 y 100 μ l, respectivamente, con una micropipeta y se colocan en cajas de Petri con medio selectivo: medio mínimo con leucina (100 μ g/ml) y NaCl 1.5 M. Así se seleccionan preferencialmente a las transformantes que en función de la carga génica adquirida sean tolerantes al cloruro de sodio.

Medio mínimo sólido:

Nitrogeno base sin aminoácidos.....	7 g/L
glucosa.....	20 g/L
agar.....	20 g/L

Estas cajas de Petri se incuban a 30 °C en un incubador Thermolyne tipo 41900. Después de 7 días, se seleccionan las colonias de mayor tamaño (aquellas que muestren un crecimiento relativo acelerado).

En el procedimiento anterior, simultáneamente, se trabaja con un control, donde el ADN transformante corresponde al plásmido YCp50 circular sin pasajero (1 µg/µl). El medio selectivo en el que se colocan las células contiene leucina (100 µg/ml) pero carece de NaCl.

Se rescatan las colonias seleccionadas y se resiembran en cajas de Petri con medio sólido selectivo. Cuando se observa crecimiento, se almacenan a 4 °C.

3. Curvas de crecimiento.

Se realizan curvas de crecimiento de las colonias transformantes de levadura para cuantificar su velocidad de crecimiento en relación al control (cepa RS16(a) transformada únicamente con el plásmido YCp50 sin ADN pasajero) en medio mínimo/leucina adicionado con NaCl 1.5 M.

Para iniciar las curvas de crecimiento se requiere de cultivos frescos, por lo tanto es necesario resembrar las colonias seleccionadas y el control en medio selectivo sólido. A partir de estas cajas de Petri, se inoculan 20 ml de medio mínimo/leucina líquido

contenidos en un matraz con capacidad de 125 ml. Las células se incuban durante la noche a 30 °C con agitación (250 rpm).

Posteriormente, las células de levadura se cosechan y se resuspenden en 1 ml de medio mínimo/leucina/1.5 M NaCl líquido.

Para conocer la cantidad de inóculo, se toma una lectura de absorbencia (a 660 nm) del cultivo nocturno realizando una dilución 1:100 en un volumen final de 1000 µl. Para ello, se colocan 990 µl del medio adicionado con sal y 10 µl de las células en suspensión en un tubo Eppendorf. Se mezclan en un vortex y las levaduras se transfieren a una cubeta de plástico (con capacidad de 1 ml).

Para inocular aproximadamente el mismo número de células, de las clonas y del control, en los matraces (con capacidad de 125 ml) que contienen 50 ml de medio selectivo, se busca que éstos tengan una absorbencia de 0.05 a 660 nm.

Para realizar el cálculo del volumen del inóculo del cultivo nocturno (V_1), se emplea la siguiente fórmula:

$$V_1 = (V_2 \times A_2) / A_1$$

donde:

$$V_1 = ?$$

$$V_2 = 50 \text{ ml}$$

A_1 = la absorbencia obtenida de la dilución x el factor de dilución (100)

A_2 = la absorbencia deseada (0.05)

Los matraces con medio selectivo se inoculan con el volúmen calculado y se verifica que se haya obtenido la absorbencia deseada. De no ser así, se agrega más medio o más células. Cuando todos los matraces presenten una $A = 0.05$, se incuban a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ con 250 rpm de agitación. Este momento será considerado como tiempo cero.

Cada 3 horas se toma de cada matraz 1 ml del cultivo, con una micropipeta de 1000 μl y su punta estéril, y se lee absorbencia a la longitud de onda ya citada. Estas lecturas se hacen por aproximadamente 72 horas o hasta que el cultivo alcance la fase estacionaria.

Por último, se elabora una gráfica semilogarítmica de tiempo vs. absorbencia (empleando el paquete Origin), se analiza y se decide si la presencia del ADN pasajero le confiere a la clona tolerancia a sal.

Para continuar la caracterización del inserto de la clona seleccionada, posteriormente se realizan curvas de crecimiento en medio mínimo/leucina adicionado de diferentes sustancias osmóticamente activas y sales (sorbitol 1.6 M, KCl 1.5 M y LiCl 0.3 M).

4. Rescate del plásmido recombinante.

Una vez que se selecciona a la clona de levadura que presenta mayor velocidad relativa de crecimiento en medio mínimo/leucina adicionado con sal se procede a la extracción del ADN plasmídico según el método de Ward (1990).

4.1. Extracción de ADN de levadura.

Se inoculan 5 ml de medio mínimo/leucina con una asada de la clona de *S. cerevisiae* seleccionada. Se incuba durante la noche a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una agitación de 250 rpm.

De la suspensión de células se toman 4 ml; se cosechan en centrifuga clínica a 3,000 rpm durante 5 minutos. El botón celular se resuspende en 400 µl de buffer de lisis; la mezcla se transfiere mediante una micropipeta a un tubo Eppendorf. Se agrega un volumen de fenol/cloroformo (1:1 (v/v)) y 0.2 g de perlas de vidrio (0.45-0.50 mm) lavadas previamente con ácido sulfúrico y esterilizadas.

Buffer de lisis:

LiCl	2.5 M
Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
Tritón X-100	4%
Na ₂ EDTA	62.5 mM

La mezcla se agita vigorosamente en un vortex durante 2 min. Se centrifuga a temperatura ambiente durante 5 minutos en una microfuga (IEC Micro-MBCentrifuge).

Posteriormente, la fase acuosa (superior) se rescata con una micropipeta y se coloca en otro tubo Eppendorf. El ADN de levadura se precipita con 2.5 volúmenes de etanol y 1/20 de volumen de acetato de sodio 3 M. Se incuba a -70 °C durante 30 min. Se centrifuga a temperatura ambiente durante 10 min.

El sobrenadante se decanta con cuidado y el pellet se lava con 1 ml de etanol al 70%. Se centrifuga como se menciona anteriormente, se decanta, y el ADN se deja secar durante 5 min. Se resuspende en 20 µl de buffer TE y se almacena en refrigeración a 4 °C.

Buffer TE:

Tris-HCl (pH 7.5)	10 mM
EDTA	1 mM

4.2. Electroforesis.

El ADN de *S. cerevisiae* se analiza por medio de una electroforesis. Esto permite calcular la cantidad de ADN obtenido en la extracción anterior y, además, facilita la transformación de *Escherichia coli* (únicamente con el plásmido recombinante, para que ésta lo amplifique).

4.2.1. Preparación del gel de agarosa al 1 %.

Se pesan 0.3 g de agarosa en un matraz Erlenmeyer y se agregan 30 ml de buffer Tris-borato (1X), el cual se prepara a partir de 25 ml de la misma solución amortiguadora (5X) que se añoran a 250 ml con agua desionizada. Se calienta hasta que la agarosa se disuelve, se deja enfriar hasta una temperatura aproximada de 40 °C, se vacía en la cámara de electroforesis (Horizon 58, Life Technologies, Inc., BRL) y se coloca el peine formador de pocillos. Cuando la agarosa ha solidificado, se vierte en la cámara de electroforesis aproximadamente 180 ml de buffer Tris-borato (1X).

Buffer Tris-borato (5X):

Tris base (pH 8.0)	54 g/L
ácido bórico	27.5 g/L
EDTA	3.72 g/L

4.2.2. Preparación del ADN del fago lambda como marcador de peso molecular.

Se utiliza como marcador de peso molecular el ADN de este fago pues se conoce el tamaño en kb de todos los fragmentos que se generan al tratarlo con las enzimas de restricción Eco RI y Hind III.

Se toman 10 µg de ADN del fago λ liofilizado y previamente tratado con las enzimas de restricción EcoRI y Hind III, se agregan 50 µl de buffer TE para tener una concentración final de 0.2 µg/µl. Se almacena en tubos Eppendorf en alícuotas de 25 µl a 4 °C.

Para la electroforesis, se toma 1 µl de éste, se agregan 9 µl de agua y 1 µl (una décima parte del volumen de la mezcla) del buffer de carga (10X). Se mezcla y se le da un pulso en la microfuga, para así poder cargar toda la muestra en los pocillos.

Buffer de carga (10X):

sacarosa	37%
EDTA	50 mM
azul de bromofenol	0.1%
SDS	0.1%

4.2.3. Preparación de la muestra de ADN de *S. cerevisiae*.

De los 20 µl de ADN de levadura obtenidos en la extracción, se toman 3 µl , se adicionan 7 µl de agua y 1 µl del buffer de carga. Se mezcla en el vortex y se le da un pulso en la microfuga.

Además, se prepara otra mezcla de reacción que contiene el ADN de levadura cortado con la endonucleasa Eco RI de la siguiente forma:

ADN de levadura	3 µl
agua estéril (para diluir al buffer TE)	8 µl
buffer para Eco RI	1.5 µl
enzima Eco RI	1 µl

Esta mezcla se incuba durante 30 min a 30 °C y, posteriormente, a 70 °C por 10 minutos. Se agrega 1.5 µl de buffer de carga (10X), se mezcla y se le da un pulso en la microfuga.

Cada mezcla de reacción, tanto de las clonas como del fago λ y un control que contiene a YCp50 sin pasajero, se coloca cuidadosamente en cada uno de los pocillos del gel y se inicia la corrida aplicando una diferencia de potencial de unos 5 V/cm (esto es, 5 volts por cada centímetro de electrodo a electrodo). Se utilizó una fuente de poder BRL, Life Technologies, Inc. modelo 250 y se corrió el gel a 90 volts.

Puede terminarse la corrida cuando la banda de azul de bromofenol se encuentre a unos 2 cm del borde anódico del gel ya que bajo estas condiciones, el azul de bromofenol comigra con moléculas de ADN de unas 300 pares de bases de longitud.

4.2.4. Tinción del gel de agarosa.

Para visualizar a las bandas de ADN, se sumerge cuidadosamente el gel en una solución de bromuro de etidio (1 µg/ml) durante 10 minutos. El exceso de bromuro de etidio se elimina enjuagando el gel en una charola con agua destilada durante 10 min.

4.3. Aislamiento de la banda del plásmido recombinante del gel.

Se coloca el gel teñido sobre una superficie plana y se visualiza con una lámpara de luz ultravioleta de onda larga, pues la iluminación del gel con luz ultravioleta de onda corta (298 nm) o de onda media (302 nm) produce una fragmentación *in situ* de los ácidos nucleicos. De esta manera, los fragmentos obtenidos por la digestión del ADN de lambda están agrupados en bandas fluorescentes discretas.

En el pocillo que contiene al ADN control sin cortar se observan únicamente tres bandas fluorescentes que corresponden al plásmido en sus tres formas: superenrollado, circular abierto y relajado.

En el pocillo cargado con ADN genómico intacto se aprecian principalmente tres tipos de bandas: el ADN genómico (de alto peso molecular), el ADN plasmídico y el ARN (por debajo de la banda de 0.56 kb del fago lambda). En el pocillo que contiene la mezcla de restricción del ADN de levadura se observan bandas fluorescentes. De las más definidas, una corresponde al vector linearizado y el resto a los fragmentos generados durante la restricción del inserto.

En el pocillo cargado con el ADN intacto, se corta con un bisturí estéril la banda que corresponde al plásmido recombinante; se coloca en un tubo Eppendorf pesado previamente y se agregan 1.5 ml de H₂O estéril por cada gramo de agarosa. El tubo se sumerge en un baño de agua a ebullición para disolver la agarosa. La concentración de la molécula recombinante se calcula en el espectrofotómetro.

4.4. Transformación genética de *E. coli* (Hanahan, 1983).

La transformación de *E. coli* se realiza por el método químico de Hanahan. El objetivo es amplificar el plásmido recombinante pues en levadura, éste se presenta en una sola copia, mientras que en la bacteria es multicopia.

Durante la noche se incuba a 37 °C a *E. coli* cepa HB101 en una caja con medio Luria sólido.

Medio Luria sólido:

Triptona	10 g/L
NaCl	5 g/L
Extracto de levadura	5 g/L
agar	20 g/L

A partir de la caja anterior, se inoculan 5 ml de medio Luria líquido que se incuban durante la noche a la misma temperatura con agitación de 250 rpm . Del cultivo anterior se inocula medio fresco en una dilución 1:50. Se incuba a 37 °C con aeramiento vigoroso hasta que las células alcancen una concentración de 5×10^7 , 1×10^8 células/ml (equivalente a una absorbencia de 0.55, 0.6 a 660 nm). Esto ocurre aproximadamente 3 horas después de haber iniciado la incubación.

Las células se transfieren a tubos de centrifuga y se incuban en hielo durante 5 minutos. Se centrifuga a 3,000 rpm (en centrifuga clínica), 10 minutos a 4 °C. El pellet se resuspende en 1/2 del volumen del cultivo original de una solución fría de CaCl_2 50 mM.

Se incuba en hielo durante 5 minutos; se centrifuga a 3,000 rpm durante 10 min a 4 °C y se resuspende el pellet en 1/15 del volumen del cultivo original de la solución fría de CaCl_2 .

El ADN transformante se agrega en 100 μl de buffer Tris 10 mM (pH 7.5) y se mezcla. Generalmente, con 100-300 ng de ADN de levadura se obtienen de 10 a 300 transformantes. Es preferible transformar a *E. coli* con no más de 300 ng pues el número de células transformantes disminuye con el exceso de ADN transformante (Rothstein, 1984).

Las células se incuban en hielo durante 25 min, se calientan a 37 °C durante 2 minutos, se incuban 10 min a temperatura ambiente y se transfieren a tubos de centrifuga con 3 ml de medio Luria.

Se incuban durante 1 hora a 37 °C, se centrifugan a 3,000 rpm a temperatura ambiente durante 10 min, el sobrenadante se descarta y las bacterias se resuspenden en el líquido remanente.

Las células se transfieren a cajas selectivas apropiadas, medio Luria con ampicilina 20 mg/L. Usualmente, el antibiótico se prepara en una solución stock a una concentración de 50 mg de ampicilina/ml de agua, se esteriliza por filtración a través de una membrana con poros de 0.22 µm de diámetro y se almacena a -20 °C.

Las colonias transformantes son resistentes a la ampicilina y aparecen después de 24 horas de incubación a 37 °C.

4.5. Minipreparación de ADN plasmídico de *E. coli*.

Se realizan minipreparaciones de ADN de las colonias transformantes de *E. coli* con el fin de verificar la presencia del plásmido recombinante y para obtener suficiente cantidad del plásmido para construir el mapa de restricción mediante digestiones con endonucleasas.

4.5.1. Método de Ausubel (1991).

Se crecen durante la noche 5 ml de las bacterias transformantes a 37 °C en medio Luria/ampicilina. Del cultivo anterior se toman 1.5 ml, se transfieren a un tubo Eppendorf y se centrifugan a temperatura ambiente en una microfuga durante 1 minuto. El sobrenadante se decanta procurando dejar el pellet lo más seco posible.

Las células se resuspenden en 100 μ l de buffer TE y se incuban a temperatura ambiente durante 5 min. Se agregan 200 μ l de la siguiente solución fresca: NaOH 0.2 N y SDS 1.0%; se mezcla por inversión y se incuba 5 minutos en hielo.

Posteriormente se adicionan 150 μ l de acetato de potasio 3 M pH 4.8 (ajustado con ácido acético glacial). Se mezcla en vortex (a velocidad máxima) durante 5 segundos, se incuba en hielo durante 5 minutos y se centrifuga durante 5 minutos en una microfuga para sedimentar los restos celulares.

El sobrenadante se recupera y, para precipitar el ADN, se agregan 900 μ l de etanol. Se mezcla por inversión y se incuba a temperatura ambiente durante 2 minutos. Se centrifuga durante 1 min, se decanta el sobrenadante y el pellet se resuspende en 100 μ l de agua. Se adiciona 1 μ l de RNAsa (10 mg/ml).

Se incuba a temperatura ambiente durante 10 min. Se agrega un volumen de fenol/cloroformo (1:1 (v/v)), se mezcla en vortex y se centrifuga a temperatura ambiente durante 5 min.

La fase acuosa (superior) se recupera y se adicionan 2.5 volúmenes de etanol y 1/20 de volumen de acetato de sodio 3 M. Se incuba a -70 °C durante 30 min y se centrifuga a temperatura ambiente durante 10 min. El pellet se lava con 1 ml de etanol al 70%, se repite la centrifugación y éste se deja secar durante 5 min. El pellet se resuspende en 20 μ l de buffer TE.

Para conocer la concentración del plásmido recombinante obtenido, se corre un gel de agarosa al 1%.

5. Restricción enzimática.

Para iniciar la caracterización del ADN pasajero de la clona de interés, se hacen digestiones de éste con 3 enzimas de restricción, Bam HI, Eco R1 y Hind III.

Para la preparación de muestras que se cortan únicamente con una de las 3 enzimas se utiliza la siguiente mezcla de reacción:

ADN plasmídico	3 μ l
agua estéril (para diluir al buffer TE)	9.5 μ l
buffer para la enzima en cuestión	1.5 μ l
enzima de restricción	1 μ l

Se incuba a 37 °C durante 30 minutos y, posteriormente, a 70 °C durante 10 min. Se adiciona 1 μ l del buffer de carga (10X); se mezcla y se le da un pulso en la microfuga.

Cuando se lleva a cabo una doble digestión se utiliza la siguiente mezcla de reacción:

ADN plasmídico	3 μ l
agua estéril	8 μ l
buffer para la primera enzima	1 μ l
enzima de restricción	1 μ l

La primera enzima será aquella que requiera del buffer salino menos concentrado.

Se incuba a 37 °C durante 30 min, se agregan 1.5 μ l del buffer para la segunda enzima y 1 μ l de la segunda enzima de restricción.

Se incuba a 37 °C durante 30 min y posteriormente, a 70 °C durante 10 min. Se adicionan 1.5 µl del buffer de carga (10X); se mezcla bien y se le da un pulso en la microfuga.

5.1. Electroforesis de las digestiones enzimáticas.

Se hace en las mismas condiciones mencionadas en el apartado 4.2. Para visualizar el ADN, se coloca el gel, ya teñido, sobre un transiluminador de luz ultravioleta de onda media o corta; se observa el patrón electroforético del ADN del fago λ. Se elabora una gráfica de distancia migrada en cm vs. tamaño del fragmento en kb, para a partir de la distancia migrada por cada fragmento de la restricción del ADN pasajero, poder extrapolar y determinar el tamaño en kb de las bandas de interés. Es importante incluir en este ensayo una muestra control, YCp50 sin pasajero y linearizado, para determinar en el gel la banda que corresponde al plásmido.

Una vez que se conoce el tamaño de los fragmentos, se elabora el mapa de restricción del inserto.

6. Secuenciación del ADN pasajero.

Para poder secuenciar al inserto, se hace una midipreparación de la clona seleccionada que se encuentre libre de impurezas.

6.1. Midipreparación.

Se lleva acabo con un "kit" QIAGEN-tip 100(Midi).

Se toma una asada de una colonia transformante de *E. coli* sembrada en medio selectivo sólido y se inoculan 5 ml de medio Luria/ampicilina líquido contenidos en un matraz con capacidad para 20 ml. Se incuba a 37 °C durante aproximadamente 8 horas con agitación vigorosa (300 rpm).

El cultivo se diluye 1/500 con medio selectivo y se inoculan otros 100 ml de medio. Las células se dejan crecer durante 12-16 horas bajo las condiciones mencionadas anteriormente y se cosechan por centrifugación a 6,000 x g (rotor JS-13, centrifuga Sorvall RC-5B a 11,500 rpm) durante 15 min a 4 °C.

Las bacterias se resuspenden en 4 ml de Buffer P1 y se les adicionan 4 ml de Buffer P2. Se mezcla por inversión (4-6 veces). Se incuba a temperatura ambiente durante 5 min.

Se agregan 4 ml de Buffer P3 frío y se mezcla como se indica anteriormente. Se incuba en hielo durante 20 min. Se centrifuga a más de 20,000 x g durante 30 min a 4 °C y el sobrenadante que contiene el ADN plasmídico se rescata rápidamente .

El sobrenadante se vuelve a centrifugar otros 15 minutos. Simultáneamente se equilibra la columna QIAGEN-tip 100 agregando 4 ml del Buffer QBT. Se espera a que ésta se vacíe por gravedad y, entonces, se pasa el sobrenadante. La columna se lava 2 veces con 10 ml de Buffer QC y el ADN se eluye con 5 ml de Buffer QF.

El ADN se precipita adicionando 3.5 ml de isopropanol. Se mezcla, se centrifuga a más de 15,000 x g durante 30 min a 4 °C y el sobrenadante se decanta con cuidado. El pellet se lava con 2 ml de etanol al 70%, se centrifuga y se decanta. El pellet se seca y se disuelve en 20 µl de agua estéril. Se calcula la concentración en un gel de agarosa al 1%.

6.2. Secuenciación del inserto.

Se utilizó un secuenciador automático de ADN ABI Prism TM 377 (Perkin Elmer, E.U.A.). Este método está basado en el propuesto por Sanger *et al.* (1977) y consiste en emplear cuatro dideoxinucleótidos marcados con moléculas fluorescentes. Durante la corrida, un rayo láser excita a estos marcadores y la información fluorescente resultante se registra en un diagrama colorido. Por este método, generalmente, se obtienen de 350 a 400 bases de la secuencia de interés, en un ciclo de reacción, con una precisión mayor al 98% (Lloyd *et al.*, 1986).

La preparación del molde es crítica para la secuenciación; para aquellos de doble cadena se recomienda usar columnas QIAGEN-tip 100. La mezcla de reacción consiste en 1.0 µg del molde (plásmido recombinante) con 3.2 picomol de iniciador en un volúmen final de 9 a 10 µl de agua.

Los factores que afectan la calidad de la secuenciación son: 1) la calidad y cantidad del ADN; 2) la calidad y cantidad del iniciador; 3) la relación iniciador-molde; 4) que la hibridación del iniciador con el ADN sea efectiva y 5) la secuencia del molde.

La secuenciación se realizó en el Instituto de Fisiología Celular, C.U., U.N.A.M.

VI

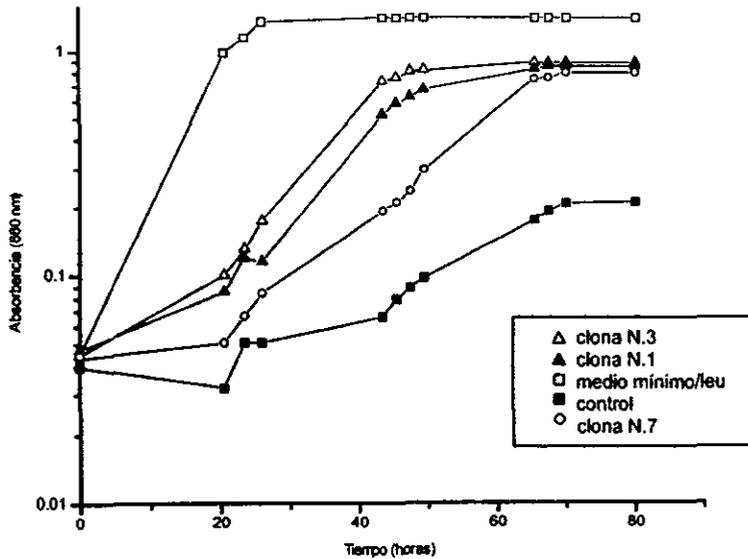
RESULTADOS

Las células de levadura, cepa RS16(a), se transformaron con una biblioteca genómica construida en el plásmido centromérico YCp50. Como medio selectivo se empleó mínimo/leucina adicionado con cloruro de sodio (1.2 M y 1.5 M). De este modo, se seleccionaron preferencialmente a las transformantes que en función de la carga génica adquirida fueran tolerantes al NaCl. Los resultados de la transformación se muestran a continuación (cuadro 2):

Medio selectivo	Número de colonias obtenidas con 50 μ l de la mezcla de transformación	Número de colonias obtenidas con 100 μ l de la mezcla de transformación
mínimo/leu/1.5 M NaCl	200	1000
mínimo/leu/1.2 M NaCl	200	1000
mínimo/leucina (control)	500	1200

Cuadro 2. Número de transformantes obtenidas a los 7 días después de colocar 50 μ l y 100 μ l de la mezcla de transformación (700 μ l) en cajas de Petri con medio selectivo a 30°C. Para el control se utilizó como ADN transformante el vector sin pasajero. Según los resultados, la eficiencia obtenida en la transformación de levadura es de 8×10^3 transformantes/ μ g ADN.

A



B

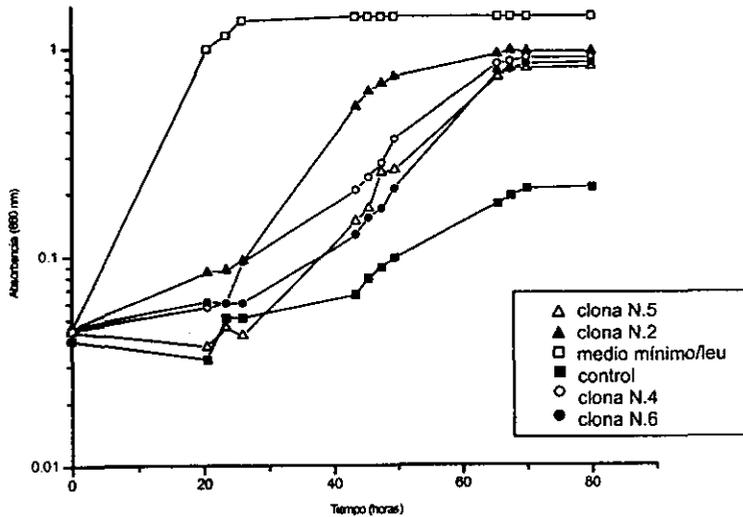


Figura 3. Inhibición del crecimiento por NaCl 1.5 M en medio mínimo/leu(glucosa). El crecimiento en medio mínimo/leu es idéntico para todas las colonias transformantes. El control utilizado es la cepa RS16(a) transformada únicamente con el vector. El crecimiento de los cultivos se siguió por su absorbancia a 660 nm. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

Después de una semana de incubación a 30 °C, se observaron siete colonias transformantes de levadura que mostraban un crecimiento relativo acelerado. Estas siete colonias de mayor tamaño (nombradas N.1-N.7) se seleccionaron y se sembraron simultáneamente en medio selectivo sólido con y sin NaCl 1.2 M.

Posteriormente, se realizaron curvas de crecimiento de estas colonias transformantes de levadura para cuantificar su velocidad de crecimiento en relación al control (cepa RS16(a) transformada únicamente con el plásmido YCp50 sin ADN pasajero) en medio mínimo/leucina adicionado con NaCl 1.5 M (figura 3).

Del análisis de la figura 3 se dedujo que la presencia del ADN pasajero parecía conferir a la clona N.3 una clara tolerancia a sal. Para intentar conocer la máxima tolerancia a sal presentada por esta clona celular, se aumentó la concentración de NaCl en el medio de cultivo a 1.6 M (figura 4).

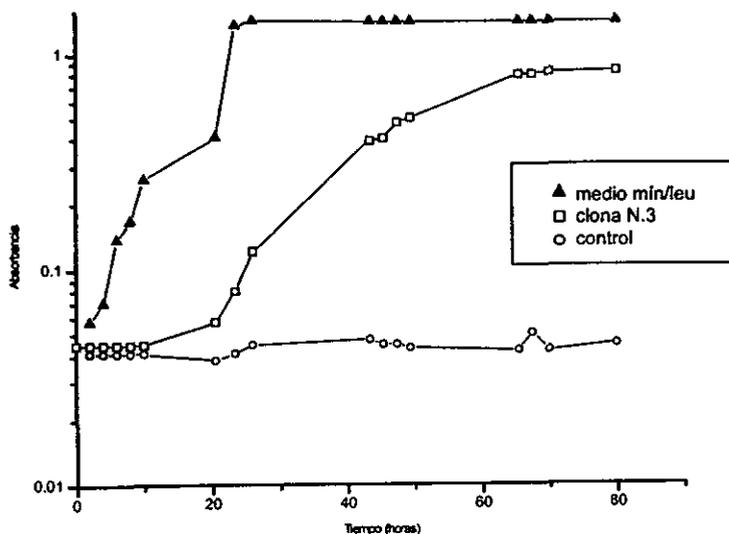


Figura 4. Inhibición del crecimiento por NaCl 1.6 M en medio mínimo/leu(glucosa). Símbolos abiertos: medio selectivo adicionado con sal. El control utilizado es la cepa RS16(a) transformada únicamente con el vector. El crecimiento de los cultivos se siguió por su absorbancia a 660 nm. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

Con la finalidad de evaluar si el fragmento de ADN pasajero pudiera estar involucrado en la ruta biosintética del glicerol se realizaron curvas de crecimiento en medio mínimo/leucina adicionado de diferentes sustancias osmóticamente activas y sales (sorbitol 1.6 M, KCl 1.5 M y LiCl 0.30 M) (figura 5) y en medio mínimo/leucina con galactosa como fuente de carbono (figura 6).

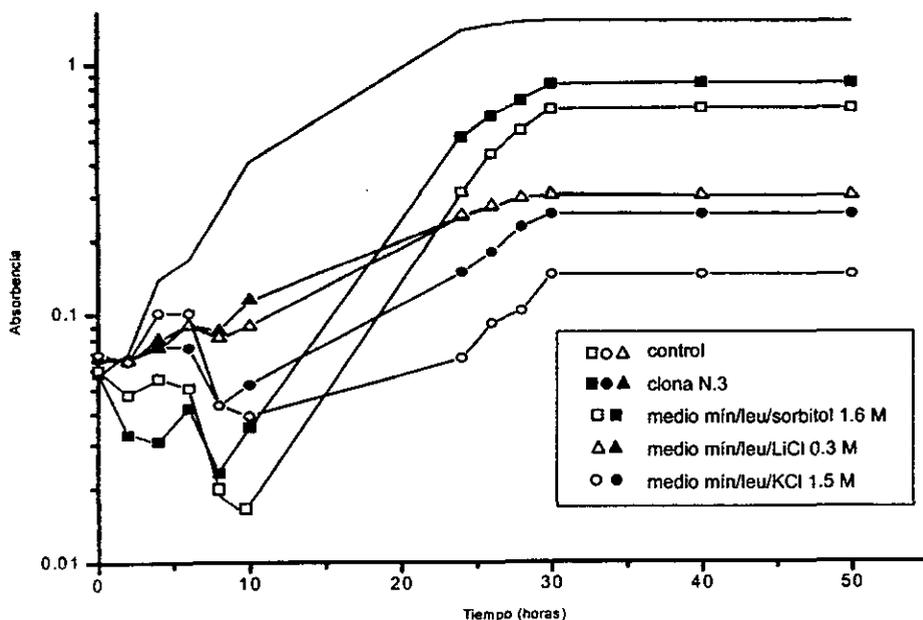


Figura 5. Inhibición del crecimiento por sustancias osmóticamente activas y sales en medio mínimo/leu(glucosa). Línea continua: crecimiento en medio mínimo/leu sin adiciones, el cual es idéntico para todas las colonias transformantes. El control utilizado es la cepa RS16(a) transformada únicamente con el vector. El crecimiento de los cultivos se siguió por su absorbancia a 660 nm. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

En la figura 5, se observa que la velocidad de crecimiento del control y de la clona en los diferentes medios adicionados con sustancias osmóticamente activas y/o sales es similar y, por ello, se pensó que el fragmento de ADN pasajero le confiere a la clona una tolerancia específica para la toxicidad provocada por el ion sodio.

En la figura 6 se aprecia que la clona tiene mayor velocidad de crecimiento en medio mínimo/leucina(glucosa)/NaCl 1.6 M que en el mismo medio con galactosa como fuente de carbono. Sin embargo, el control no puede crecer sin importar la fuente de carbono adicionada.

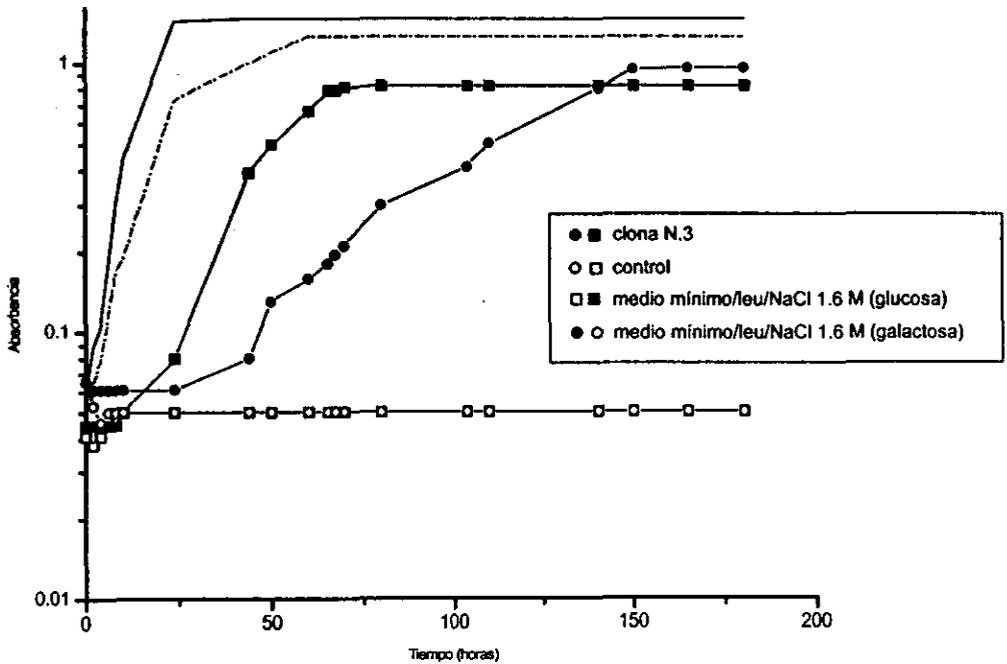


Figura 6. Inhibición del crecimiento por NaCl 1.6 M en medio mínimo/leu(glucosa o galactosa). Línea continua: crecimiento en medio mínimo/leu(glucosa) y discontinua: crecimiento en medio mínimo/leu(galactosa) sin adiciones. El control utilizado es la cepa RS16(a) transformada únicamente con el vector. El crecimiento de los cultivos se siguió por su absorbancia a 660 nm. Se obtuvieron resultados similares en tres experimentos independientes.

Para rescatar al plásmido recombinante se realizó una extracción de ADN de *Saccharomyces cerevisiae* (clona N.3), y la transformación de *Escherichia coli*. El objetivo de ambos procedimientos fue amplificar al plásmido centromérico con pasajero ya que en levadura éste se presenta en una sola copia, mientras que en la bacteria es multicopia.

Para transformar a *E. coli* únicamente con el plásmido recombinante, se cargaron 3 μ l del ADN total obtenido en la extracción mencionada, se corrió un gel de agarosa al 1%, del cual se recortó la banda que corresponde al vector con pasajero intacto y se disolvió la agarosa en agua. Con la estrategia anterior se pudo calcular la concentración de la molécula recombinante en el espectrofotómetro (0.1 μ g/ μ l) y, posteriormente, con 0.3 μ g se transformó por el método químico a *E. coli*.

Por el número de colonias que aparecieron a las 24 horas de incubación en las cajas de Petri con medio Luria/ampicilina, la eficiencia de la transformación se calculó en 1×10^6 transformantes/ μ g de ADN.

Se rescataron algunas de las colonias transformantes de *E. coli* para hacer minipreparaciones de ADN con el objetivo de verificar la presencia del pasajero mediante un ensayo de restricción (figura 7). La concentración calculada para este ensayo fue de 0.27 μ g de ADN plasmídico/ μ l.



Figura 7. Gel de agarosa al 1%. Restricción enzimática con BamHI (pocillos 2, 4 y 6) y con EcoRI-BamHI (pocillos 3, 5 y 7) del ADN plasmídico de: clona N.1 (pocillos 2 y 3); clona N.2 (pocillos 4 y 5) y clona N.3 (pocillos 6 y 7). Como marcador de peso molecular se utilizó el ADN (0.2 μ g) del fago λ pues se conoce el tamaño en kb de todos los fragmentos que se generan al tratarlo con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII (pocillos 1 y 8).

Con los μg restantes del plásmido se procedió a retransformar a la cepa de levadura RS16(a) con la molécula recombinante para corroborar el fenotipo observado en cloruro de sodio. Simultáneamente, para iniciar la caracterización del ADN pasajero de la clona de interés, se hicieron ensayos de restricción con endonucleasas.

La retransformación de levadura fue exitosa pues se tuvo una eficiencia de 9×10^3 transformantes/ μg de ADN. Se realizaron nuevamente curvas de crecimiento en medio mínimo/leucina/NaCl 1.6 M y se presentó el mismo fenotipo observado anteriormente (figura 4).

En cuanto a la caracterización del inserto, se realizaron digestiones de la molécula recombinante con otras dos enzimas de restricción (figura 8).

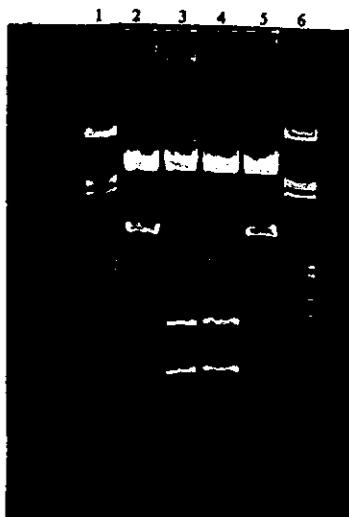


Figura 8. Restricción enzimática del ADN plasmídico de la clona N.3. Pocillos 1 y 6: ADN del fago λ previamente tratado con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII; pocillo 2: digestión con HindIII; pocillo 3: restricción con EcoRI; pocillo 4: digestión con EcoRI y HindIII; pocillo 5: restricción con HindIII y BamHI. En todos los pocillos se utilizaron 0.8 μg de ADN; el gel de agarosa se preparó al 1%.

Como se observa en la figura 8 hay demasiado ADN plasmídico, lo que no nos permite distinguir si la banda de unas 8 kb de longitud se trata de una sola especie molecular de aproximadamente 8 kb o de un número mayor de moléculas de longitudes similares. Para definir esta situación se realizó otra digestión con las tres enzimas de restricción empleadas utilizando una menor cantidad del plásmido (figura 9) en un gel de agarosa al 0.8%.



Figura 9. Restricción enzimática del plásmido recombinante. Pocillos 1 y 8: ADN del fago λ previamente tratado con las enzimas de restricción EcoRI y HindIII; pocillo 2: digestión con BamHI; pocillo 3: restricción con EcoRI; pocillo 4: digestión con HindIII; pocillo 5: restricción con EcoRI y HindIII; pocillo 6: digestión con HindIII y BamHI; pocillo 7: restricción con EcoRI y BamHI. En todas las mezclas de restricción se utilizaron 0.4 μ g de ADN.

Gracias a este segundo gel se lograron separar las dos bandas de 7.8 kb (corresponde al plásmido YCp50 linealizado) y de 7.3 kb (fragmento de restricción del ADN pasajero).

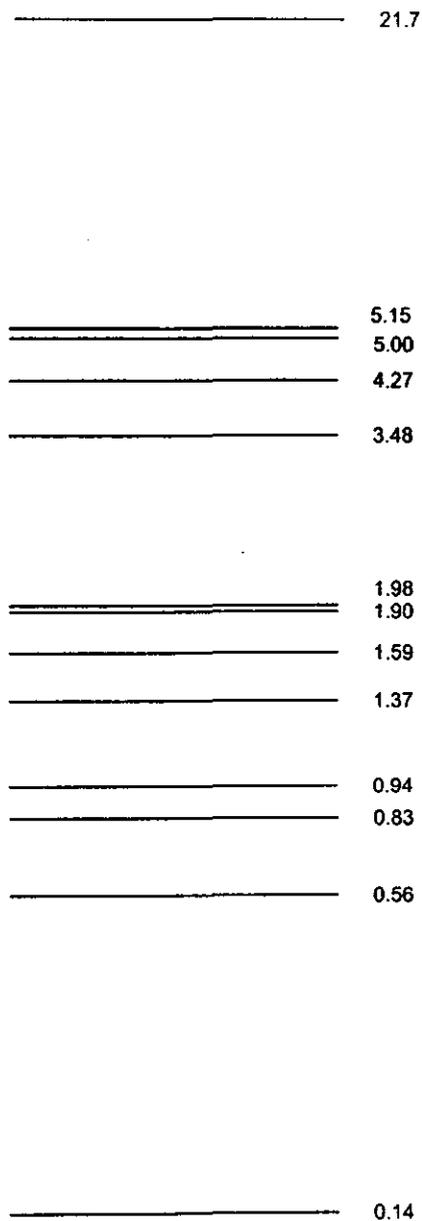


Figura 10. Patrón electroforético de los fragmentos de restricción (kb) del ADN de lambda generados con las enzimas EcoRI y HindIII.

El tamaño en kb de las bandas de interés (figura 12) se calculó a partir de una gráfica de distancia migrada vs tamaño del fragmento (figura 11) construida con el patrón electroforético de los fragmentos del ADN del fago λ (figura 10). Después de que se determino el tamaño de las bandas, se elaboró el mapa de restricción del ADN pasajero (figura 13).

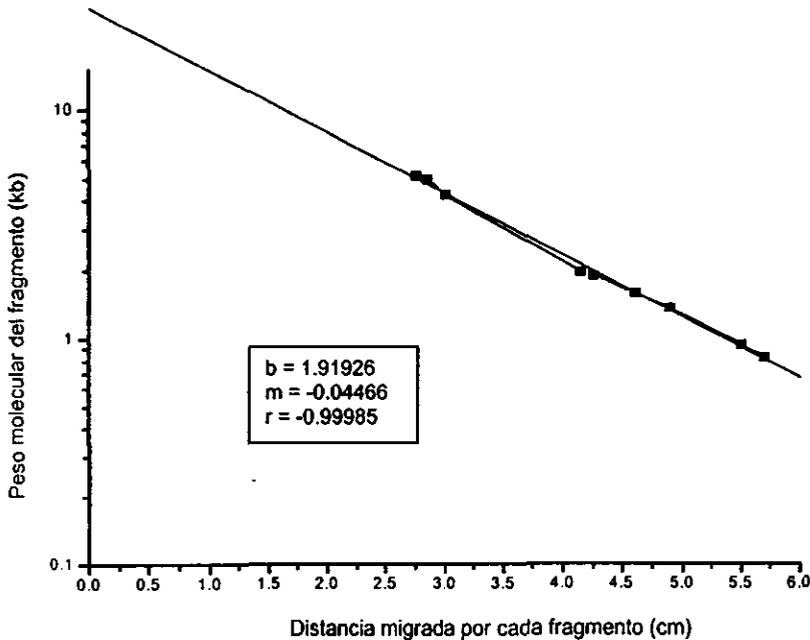


Figura 11. Distancia migrada vs tamaño del fragmento. Esta gráfica nos permite calcular el tamaño en kb de los fragmentos de restricción del inserto. Se construye en base al patrón electroforético de los fragmentos del ADN del fago λ .

Para secuenciar al inserto, se hizo una midipreparación de la clona N.3 y se obtuvieron 10 μg que se llevaron a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La secuenciación de los primeros 350 nucleótidos del inserto, localizados en el extremo BamHI, se realizó por el método de Sanger modificado (Lloyd *et al.*, 1986) (figura 14). Actualmente, el genoma de levadura se conoce en su totalidad y, por lo tanto, la información anterior fue suficiente para ubicar al ADN pasajero en el cromosoma XIV. Se consultaron las bases de datos para conocer la secuencia completa del inserto (Apéndice I).

BamHI	EcoRI	HindIII	EcoRI-HindIII	HindIII-BamHI	EcoRI-BamHI
11	7.8	7.8	7.8	7.8	7.8
	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3
		3.0		3.0	
	1.3		1.4		1.3
	0.8		0.83		0.9
			0.53		0.7

Figura 12. Tamaño en kb de los fragmentos generados en la restricción enzimática del plásmido recombinante.

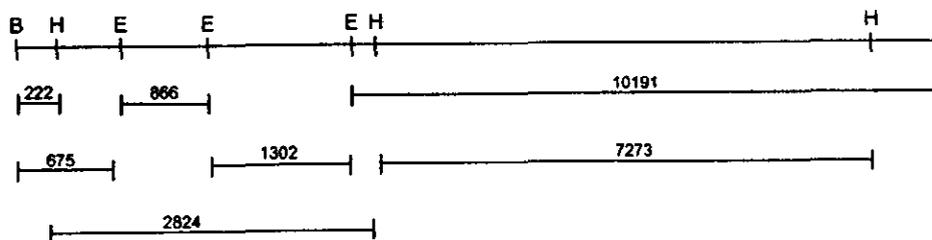


Figura 13. Mapa de restricción del inserto de 10 kb presente en la clona N.3. El número colocado arriba de cada fragmento corresponde a la longitud de éste expresada en pares de bases (pb).

Como se observa en la figura 15, dentro de la secuencia de interés se tienen tres marcos abiertos de lectura (ORF, Open Reading Frame) completos y dos incompletos. Se realizó la comparación de cada uno de éstos contra las bases de datos (Genbank y Yeast Genome Database).

A partir de la información obtenida en los bancos de datos y de la búsqueda bibliográfica se encontró lo siguiente:

El marco abierto de lectura YNR069c (incompleto por falta de su extremo 5') muestra una similitud del 33.1% con la proteína *Bul1p* codificada en el cromosoma XIII y que se involucra en la vía de ubiquitinación de las proteínas (Yashiroda *et al.*, 1996). La alineación de la secuencia es del 80.1%. Se presume que YNR069c podría codificar para una proteína cuyo precursor tiene un peso molecular de 54.8 kDa y un punto isoeléctrico de 5.59

El marco abierto de lectura YNR068c (completo) muestra una similitud del 31.4% con la misma macromolécula *Bul1p* mencionada anteriormente. Ésta es la responsable de marcar a las proteínas que serán degradadas (Yashiroda *et al.*, 1996). Se piensa que YNR068c podría codificar para un precursor de 272 aminoácidos con punto isoeléctrico de 9.98 y un peso molecular de 31.2 kDa. El porcentaje de alineación de la secuencia es de 78.6%.

El caso del marco abierto de lectura YNR067c (completo) es más complicado pues, además de ser el más grande, presenta baja similitud con diversos genes (cuadro 3). Se presume que podría codificar para un precursor de 1,117 aminoácidos con peso molecular de 121 kDa y punto isoeléctrico de 4.4.



Model 310
Version 3.0
Semi-Adaptive
Version 3.0

N.C./primer1275
Nahanny Canal Fl.
480
Lane 4

Signal G:539 A:454 T:439 C:351
DT POP5(BD Set-Any Primer)
dPhod matrix
Points 780 to 10240 Base 1:760

Page 1 of 2
Mon, Nov 16, 1998 2:17 AM
Sun, Nov 15, 1998 11:31 PM
Spacing: 11.13(11.13)

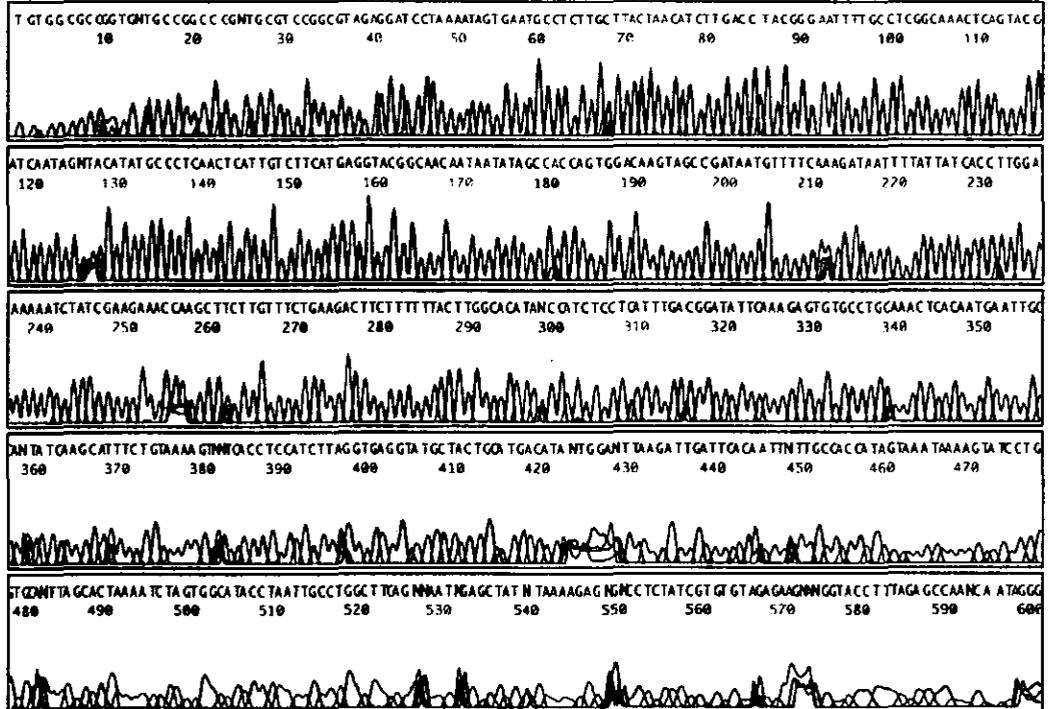


Figura 14. Secuencia de los primeros 350 nucleótidos del extremo BamHI del ADN pasajero de 10 kb de longitud.

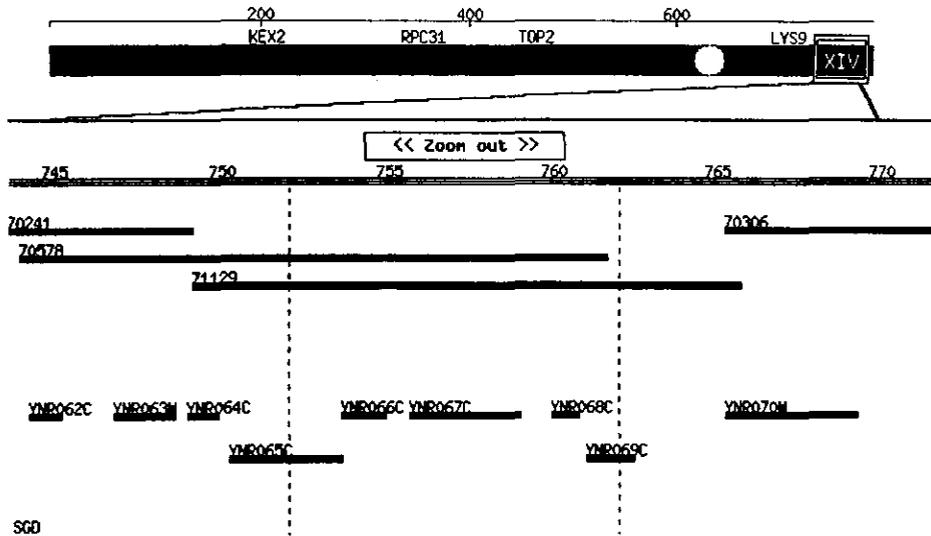


Figura 15. Localización del inserto en el cromosoma XIV de *Saccharomyces cerevisiae*. El inserto contiene tres marcos abiertos de lectura completos y dos incompletos. Los cinco se transcriben en el sentido Crick.

El gen *SED4* del cromosoma III de *S. cerevisiae* se traduce en una proteína integral de membrana del retículo endoplásmico importante, más no necesaria, para la formación de vesículas. Cuando se lleva a cabo la delección de este gen, se observa que disminuye la velocidad de transporte de la proteína marcadora CPY (carboxipeptidasa Y) del retículo endoplásmico al complejo de Golgi (Gimeno *et al.*, 1995). La CPY es una proteína que marca a las proteínas que se van a transportar del aparato de Golgi a un endosoma y, posteriormente, a la vacuola (Marcusson *et al.*, 1994).

El gen *SLK1/BCK1* de *S. cerevisiae*, contenido en el cromosoma X, codifica para una cinasa de 1,478 aminoácidos involucrada en la morfogénesis celular y en el control del crecimiento celular. Se piensa que esta enzima es el eslabón regulatorio entre estos dos procesos celulares pues las proteincinasas pueden tener varios sustratos diferentes y porque participa en la síntesis de la pared celular (Costigan *et al.*, 1992).

Gen	% de similitud	% de alineación
<i>SED4</i>	9.3	46.4
<i>SLK1/BCK1</i>	7.6	30.0
<i>PPZ1</i>	7.1	30.8
<i>WSC4</i>	6.5	25.7
<i>WSC1/SLG1</i>	5.1	14.8

Cuadro 3. Porcentaje de similitud y de alineación de la secuencia del marco abierto de lectura YNR067c con posibles genes relacionados.

El gen *PPZ1* del cromosoma XIII de *S. cerevisiae* codifica para una fosfatasa de 692 aminoácidos, con peso molecular de 77.5 kDa que mantiene la integridad osmótica de la pared celular, que participa en la transmisión de la señal que percibe la presión osmótica y en la organización del citoesqueleto (Posas *et al.*, 1993). Se piensa que tiene funciones que se sobrelapan (Hughes *et al.*, 1993). También está involucrada en la homeostasis salina pues la delección de *PPZ1* resulta en un aumento en la tolerancia a iones sodio y litio (Clotet *et al.*, 1996). Lo anterior se podría deber a que la cepa mutante elimina mejor los cationes mencionados como resultado de una mayor actividad por parte de la ATPasa involucrada (figura 16). Ésta se codifica en el gen *ENAI/PMR2A* (la mayor bomba responsable de la salida de Na⁺ y Li⁺) que presenta mayor transcripción en ausencia del gen *PPZ1* (Posas *et al.*, 1995).

El gen *WSC4* del cromosoma VIII de *S. cerevisiae* codifica para un componente de la familia de proteínas (WSC1, WSC2 y WSC3) involucradas en la respuesta al estrés por calor y en la biosíntesis de la pared celular. Las mutaciones de este gen resultan en lisis celular (que se puede evitar adicionando sorbitol 1 M) y en deficiencia en la respuesta al estrés por calor (Verna *et al.*, 1997).

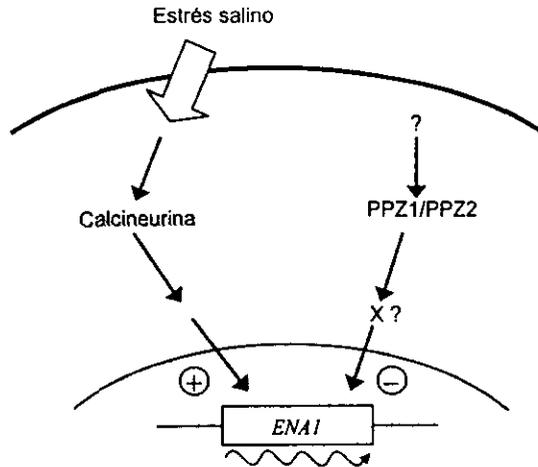


Figura 16. Modelo tentativo de la función de PPZ1 en la homeostasis salina.

El gen *WSC1/SLG1* de *S. cerevisiae* presente en el cromosoma XV codifica para un componente de la familia de proteínas mencionada anteriormente. Las células mutantes presentan lisis a temperaturas elevadas que se corrige con la adición de sorbitol 1 M; éstas también son sensibles a la presencia de cafeína en el medio de cultivo (Jacoby *et al.*, 1998).

El marco abierto de lectura YNR066c (completo) muestra una similitud del 50.6% con la secuencia de la proteína Pep1p codificada en el cromosoma II de *S. cerevisiae*. Ésta es un receptor para la CPY (carboxipeptidasa Y) pues la transporta del complejo de Golgi a un endosoma. Posteriormente, la CPY será transportada a la vacuola (Marcusson *et al.*, 1994). Se considera que YNR066c podría codificar para un precursor de 436 aminoácidos con punto isoeléctrico de 5.0 y un peso molecular de 49.6 kDa. El porcentaje de alineación de la secuencia es de 99.5.

El marco abierto de lectura YNR065c se encuentra incompleto en el inserto faltándole su extremo 3'. Al comparar la secuencia de YNR065c completa, ésta muestra una similitud del 76.7% con la secuencia de la proteína Pep1p referida anteriormente. Pep1 se encuentra

formada de dos dominios, el amino y el carboxilo. Este último contiene una cola citoplasmática de 164 aminoácidos que le confiere la actividad mencionada (Marcusson *et al.*, 1994). YNR065c podría codificar para una precursor de 1,116 aminoácidos con punto isoeléctrico de 4.95 y un peso molecular de 125.1 kDa. La alineación de la secuencia es de 99.9%.

VII

DISCUSIÓN

La tolerancia a los agentes estresantes del medio ambiente es un factor determinante en la supervivencia de los organismos que carecen de la capacidad para escapar de su entorno. Éstos, con frecuencia se confrontan con grandes cambios en las concentraciones iónicas del medio que desafían a sus mecanismos de homeostasis. Estos mecanismos mantienen a los iones intracelulares dentro de un intervalo pequeño y compatible con la vida (Ferrando *et al.*, 1995).

Para poder aislar secuencias halotolerantes de *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó una estrategia directa: transformar células de levadura con una biblioteca genómica contenida en un plásmido unicopia y seleccionar a las transformantes en medio selectivo con una concentración elevada de cloruro de sodio. Este procedimiento es muy útil al trabajar con un modelo experimental como las células de levadura, pero es más difícil, técnicamente hablando, si el objeto de estudio son plantas superiores.

Posteriormente, se realizaron curvas de crecimiento de las colonias transformantes seleccionadas en medio mínimo/leu adicionado con NaCl 1.5 M. En la figura 3 se muestra el efecto inhibitorio de la sal en el crecimiento del control y de las diferentes clonas. A simple vista se puede observar que las clonas N.1, N.3 (panel A) y N.2 (panel B) son las que presentan una mayor velocidad de crecimiento y una fase de adaptación (*lag*) más breve en relación al comportamiento del control. De éstas, la clona que, en función del ADN pasajero contenido en el vector, presenta una clara tolerancia a sal es la denominada N.3. Para intentar conocer la máxima tolerancia a la sal presentada por esta clona celular, se

aumentó la concentración de NaCl en el medio de cultivo. En la figura 4 podemos observar como la velocidad de crecimiento de la clona de interés, a una concentración de sal 1.6 M, permaneció casi inalterada mientras que la del control disminuyó drásticamente. Se podría mencionar que la levadura RS16(a) transformada únicamente con el plásmido sin inserto mostró inhibición intensa del crecimiento a una concentración de NaCl 1.6 M.

El cloruro de sodio genera dos tipos de estrés en las células: el osmótico y la toxicidad por sodio. Para combatir al estrés osmótico, las células acumulan dentro de ellas solutos compatibles (osmolitos) con las macromoléculas y funciones propias (Serrano, 1996). Es importante mencionar que esta respuesta no es específica para el NaCl. En levadura, el osmolito que se acumula principalmente para contrarrestar la presión osmótica externa es el glicerol (Blomberg y Adler, 1989). El gen *GPD1* codifica para la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa citoplasmática que aumenta la síntesis de este osmolito en una situación de alta osmolaridad externa (Albertyn et al., 1994).

Varios aspectos de la fisiología de levadura se modulan por la naturaleza de la fuente de carbono presente en el medio de cultivo; la glucosa desempeña un papel diferente en comparación a otros carbohidratos (galactosa, por ejemplo) (Ríos *et al.*, 1997). En condiciones de estrés salino, cuando la fuente de carbono es glucosa, el ajuste osmótico es más activo debido a la conversión directa de este carbohidrato en glicerol y a su retención dentro de las células (Blomberg y Adler, 1989) (el ciclo metabólico del glicerol se muestra en la figura 1 de la introducción).

Para definir si el ADN pasajero le confiere a la clona tolerancia al NaCl, por la disminución del efecto osmótico de esta sal mediante la biosíntesis de glicerol o por un descenso en la toxicidad generada por el Na^+ , se realizaron curvas de crecimiento de la clona y el control en presencia de sustancias osmóticamente activas y de sales, así como en medio selectivo adicionado con NaCl 1.6 M y galactosa como fuente de carbono.

En la figura 5 podemos observar que prácticamente la velocidad de crecimiento del control y de la clona celular es muy similar, independientemente de la sustancia osmóticamente

activa y/o sal adicionada al medio selectivo líquido. Debido a lo anterior, se podría suponer que el inserto le confiere a la clona N.3 una tolerancia específica para la toxicidad provocada por el ion sodio.

Para evaluar si el ADN pasajero se encontraba, de alguna forma, relacionado con la ruta biosintética del glicerol, se realizaron curvas de crecimiento en medio selectivo con glucosa o galactosa como fuente de carbono. Como se aprecia en la figura 6, la velocidad de crecimiento de la clona celular se ve afectada cuando la fuente de carbono es galactosa en relación a la que presenta en el medio selectivo con glucosa. Ésto se podría deber a que la sal presente en una concentración de 1.6 M ejerce su efecto osmótico y la célula, para contrarrestarlo, inicia el anabolismo de glicerol. Cuando en el medio de cultivo tenemos glucosa como fuente de carbono, la síntesis de este osmolito es inmediata; sin embargo, cuando la fuente de carbono es galactosa se requieren de etapas adicionales para transformar a este sustrato en glucosa y continuar con la repuesta inespecífica de acumulación de glicerol. Esta misma figura nos muestra la inhibición del crecimiento del control, independientemente de la fuente de carbono adicionada, a pesar de que esta célula también tiene la capacidad de responder inespecíficamente acumulando glicerol en su interior (Blomberg y Adler, 1989). Por lo tanto, la inhibición del crecimiento del control se debe a la presencia de gran número de iones sodio en el medio de cultivo pues cuando se utilizaron otras sustancias activas y sales en concentraciones osmóticamente equivalentes, se observó (figura 5) que el control y la clona mostraban una velocidad de crecimiento muy similar. De lo anterior se concluye que, bajo estas condiciones de crecimiento, únicamente la clona N.3 es capaz de desarrollarse y se debe a que el inserto le confiere tolerancia a la toxicidad del Na^+ .

Después de la transformación de *E. coli* para rescatar y amplificar al plásmido recombinante, se realizaron minipreparaciones y digestiones enzimáticas con endonucleasas. En la figura 7 se muestran los ensayos de restricción de las tres clonas transformantes de levadura (N.1, N.2 y N.3) que mostraron una mayor velocidad de crecimiento (figura 3) en medio mínimo/leu adicionado de NaCl 1.5 M. En este gel de agarosa podemos apreciar lo siguiente:

Para la clona N.1 es difícil que el vector contenga un pasajero pues en el pocillo donde se colocó la muestra en la que se llevó a cabo la restricción con las enzimas EcoRI-BamHI aparece únicamente una banda que, seguramente, corresponde al plásmido linearizado.

Para ambas clonas (N.2 y N.3), en los pocillos 5 y 7 de esta figura aparecen varias bandas que corresponden, con excepción de una (contiene al vector linearizado), a los diversos fragmentos del ADN pasajero generados en la restricción enzimática con EcoRI-BamHI. En los pocillos 4 y 6 se observa una sola banda a pesar de la digestión con la endonucleasa BamHI. Por estas observaciones se piensa que las moléculas recombinantes, cuando se encontraban dentro de levadura, perdieron uno de los sitios donde actúa la enzima BamHI.

Para continuar con la caracterización del inserto, en la figura 8 se aprecia que la cantidad de ADN plasmídico empleado fue excesiva, por lo que no se puede distinguir si la banda de aproximadamente 8 kb, que aparece en los pocillos 2-5, corresponde a una sola especie molecular. Para averiguarlo, en la figura 9, se colocó en cada pocillo la mitad de la cantidad de ADN empleada anteriormente, además de que el gel de agarosa se preparó a una concentración del 0.8%. En esta figura se muestra claramente como la longitud de uno de los fragmentos de restricción del ADN de la clona (7.3 kb) es muy similar a la longitud del plásmido YCp50 linearizado (7.8 kb).

En la figura 12 se presenta el tamaño en kb de los fragmentos generados en la restricción enzimática del plásmido recombinante. Con esta información fue posible la construcción del mapa de restricción del inserto de aproximadamente 10 kb (figura 13).

Con la información obtenida por la comparación de secuencias y en las referencias bibliográficas se realizó un análisis para tratar de definir que marco abierto de lectura podría contener al(los) gen(es) que se encuentra(n) involucrados en el fenómeno de la tolerancia a sal mostrado por la clona de interés.

Es importante mencionar que en la comparación de los cinco marcos abiertos de lectura contenidos en el inserto con los bancos de datos se encontró que el común denominador fue el bajo porcentaje de similitud con las secuencias de función conocida, ya reportadas.

Se piensa que el marco abierto de lectura YNR069c no es el responsable del fenómeno observado pues, al encontrarse incompleto, no contiene ni a su promotor ni a la región correspondiente al sitio activo de la enzima Bullp involucrada en la vía de ubiquitinación de proteínas (Yashiroda *et al.*, 1996).

La secuencia del marco abierto de lectura YNR068c, también similar a la del gen de Bullp pero con una longitud de únicamente 815 pares de bases, se transformó a la correspondiente secuencia de aminoácidos (que serían traducidos a partir de esta región) y se observó que no contendría al extremo amino de Bullp, el cual le confiere la actividad a esta enzima (Yashiroda *et al.*, 1996).

La secuencia del marco abierto de lectura YNR065c consta de 3,350 pares de bases. El inserto de la clona N.3 contiene únicamente 1,173 pares de bases del extremo 5', por lo que se encuentra incompleto. Se piensa que este segmento de la secuencia de interés no es el responsable del fenotipo observado pues, al inferir la secuencia de aminoácidos a partir de la secuencia de nucleótidos, no contiene la cola citoplasmática (localizada en el extremo carboxilo de la enzima) responsable de la actividad de la proteína PepI (Marcusson *et al.*, 1994).

La longitud del marco abierto de lectura YNR066c es de 1,310 pares de bases que se podrían traducir en 436 aminoácidos. La proteína PepI (reportada como un receptor para la carboxipeptidasa Y) se encuentra formada por 1,300 aminoácidos, de los cuales 164 constituyen una cola citoplasmática que provee la actividad enzimática (Marcusson *et al.*, 1994). Esta secuencia de 164 aminoácidos no se presenta en YNR066c, por lo que se piensa que este marco abierto de lectura tampoco podría ser el responsable de la tolerancia a NaCl mediante un posible mecanismo de compartimentalización de iones tóxicos para la célula.

El marco abierto de lectura YNR067c es el más grande presente en el inserto clonado, con una longitud de 3,353 pares de bases, y hay consideraciones teóricas sugestivas de que sea el que contiene la información necesaria para la tolerancia a sal. En primer lugar, se considera que el fenotipo observado no se debe a que se aumentó la dosis génica de alguno de los posibles genes antes mencionados pues es muy bajo el porcentaje de similitud y de alineación de la secuencia con estos efectores del transporte o de la homeostasis.

A partir de la secuencia de nucleótidos, del marco abierto de lectura de interés, se obtuvo la secuencia de aminoácidos (que serían traducidos a partir de esta región) de la posible proteína codificada en YNR067c (figura 17). Con la secuencia anterior y con el banco de datos (*Saccharomyces Genome Database*) se determinó que la estructura secundaria (figura 17) corresponde a la de una proteína globular alfa/beta. Esta secuencia de aminoácidos no presenta similitud con transportadores, con moléculas que participan en la señalización o con factores de transcripción previamente descritos. Por ello, este marco abierto de lectura, completo o algún segmento de éste, pudiera codificar para un(os) gen(es) halotolerante(s) no estudiado(s) anteriormente.

Solamente podemos especular sobre el mecanismo de éste(os) para la tolerancia a sal. En la figura 18 se muestra el perfil de hidrofobicidad de la posible proteína codificada en YNR067c; esta información se obtuvo utilizando el programa NPS (*Network Protein Sequence*) (Kyte y Doolittle, 1982). El análisis de este perfil apunta a que la proteína de interés se podría localizar en membrana y, por la figura 5, sabemos que no participa en el ajuste osmótico. Además, la sobreexpresión de este marco abierto de lectura le confiere a levadura una ventaja en la velocidad de crecimiento, siendo específica para cloruro de sodio a elevadas concentraciones (figura 4). Por los resultados que se muestran en la figura 5, se piensa que YNR067c podría estar particularmente involucrado en la tolerancia a Na^+ . Las bases moleculares de los sistemas de transporte para sodio y potasio en levadura y plantas se encuentran en estudio. Como se menciona en la introducción, poco a poco, se empiezan a comprender los mecanismos de inclusión y exclusión de iones.

1	MQLYLTLFLFLSFVECSYISFISNNADEILETDLIETLSYATLTVGEPYV ccchhhhhhhhhhhheeeeeeeeecccccccccccccccccccccccccccc	50
51	AQSVVTRVSAASHSPLSVSPKNRVSASFINSQSDSENTRTAVQLSLSLSL eeeeeeeecc	100
101	NYASQVSKISAQTNNDPVTVSNIIYANDNSKSKSSVHNLSSVSGVASVMP hhhhhhhhhhhhhhcc	150
151	SASTMRKVTTLTQSTASTSTLTFSSSLISIGTQLNGTLLTSVSKGTIDP ccccchhhhhhhcc	200
201	LVTQMPFSYSSQETKIIPELSTSNKTIYTIIVRTNAATATGEDSFIATPA eeeecc	250
251	SSTLFYFNSNSTQDLVQTLASTTASPAYFSNRTQITLFSFVSLYSTTSPYI ccccccccccccchhhhhhhcccccccccccccccccccccccccccccccc	300
301	FNITENGSSPSPSLSSSTVYFVYFSSSTGNILLSSLFSTVDSSSSPVSS cc	350
351	LDTIYVSSSMQATISSSSSRQTKTSSSLSTSTSTSTATTNHSSTTIV cc	400
401	NLFNAVSTDEPPIVFDSPFNFMSLADGVSNDGPIQTNKFIYTNLIVGSQES cc	450
451	FAPVYFYLWKYTSYSGFAVQHTVDQYSYGGYDSSGNAEYLVNPLGIA cc	500
501	HVVFSASHFDSNMTQVDEMTELSSTRVVLSEKNDSSNYLEIPLVQQNGFA eeeecc	550
551	TGIYNGSLNARKIGSSVGFHTIVSESSSLAQGILKYRITLLNGVTVLQYV eeeecc	600
601	IGPDDLSTDFLEVSSEYKIKASAVDGLIQLAVAFSTDYEVFYDQA cc	650
651	AGMYVTFPKLQGVSDGSTATYEFYTTQGESASGSTMIFALPHNHSFSD cc	700
701	IMQDYXTGIQLASTTKGVMMGYLTTSLQFSTSLNRQISWLPWSSQLGSNL hhhhhhhhcc	750
751	LEYSKEQLQLLAEVANSLELQVSISESI SGLNTYYLGRVIDRYSYILLTVS hhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhhcccccccccccccccccccccccccccc	800
801	EIIQDEASTKSTLENIKSAFDILLQNEQTYFLIYDTKFNGLVSSGDNGST hcc	850
851	STQYDFONTYYNDHNFHYGIINAAAVIGYVDSKLNCTWAADMKDWVMSL cc	900
901	VADVANFSEKDEYFAQSRMFDWFGNHSWAAGLYENGNKNEESSSEDYNF hhcc	950
951	AYAMKLGATIGDQSMELRGDLNISIMKDAMNDYFYYQMDNTVEPEIIG hhhhhhhhhhcc	1000
1001	HEVSGILFDNIIIDYTYFGTNTRYINGTHMLFITPVSSNIRSETPVEREN cc	1050
1051	QTKIEPIESIESGWTGILKLELQALFDPVDSYAFFSDSTFDSSTYLDNGM hhhhhhhhhhhhcc	1100
1101	SRTWALAFSGGLANSIA cc	1117

Figura 17. Traducción en aminoácidos de YNR067c y posible estructura secundaria de la proteína. Las letras mayúsculas corresponden a los aminoácidos de acuerdo a la convención internacional. (h: hélice alfa, c: giro y e: beta plegada).

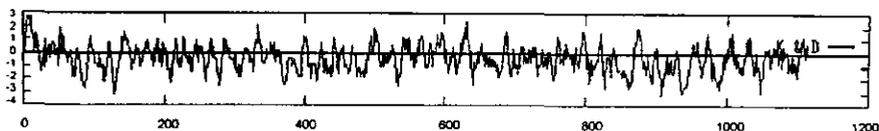


Figura 18. Perfil de hidrofobicidad de la posible proteína codificada en el marco abierto de lectura YNR067c. Se obtuvo de acuerdo al NPS (*Network Protein Sequence*) de Lyon, Francia.

Para continuar este trabajo de investigación, inicialmente se realizarían ensayos de subclonación para delimitar, con precisión, la región de la secuencia del marco abierto de lectura que contiene al gen de interés.

Para determinar si este gen realmente se expresa en condiciones salinas, se podría llevar a cabo una extracción de ARNm total de dos grupos de células: levaduras transformadas con la molécula recombinante crecidas con y sin NaCl 1.6 M, que se cosechan durante la fase exponencial. Se continuaría con el análisis (*Northern*) separando el ARNm por electroforesis en un gel desnaturizante que contenga formaldehído. Al finalizar la corrida, se transfieren las moléculas de ARN a un filtro de nylon, que se coloca en un horno (80°C) para asegurar que los ácidos nucleicos queden irreversiblemente unidos al soporte sólido. Por último, el ARN, contenido en el filtro, se incuba con una sonda marcada radiactivamente (la secuencia de ADN del marco abierto de lectura clonado). Al finalizar el período de hibridación, se lava varias veces con un buffer que contiene SDS, se procede a exponer la placa autoradiográfica y, finalmente, se revela la placa de rayos X colocándola en la solución del revelador.

Para demostrar que el mensaje del marco abierto de lectura se traduce en una proteína se requiere de un procedimiento conocido como *Western Blot*. Este consiste en obtener los anticuerpos correspondientes a la proteína codificada en la secuencia de interés expresándola en *Escherichia coli* como una proteína de fusión. Posteriormente, se realiza una extracción de proteínas totales de esta bacteria para inyectárselas a algunos conejos, que generaran a los anticuerpos. Del suero animal se extraen los anticuerpos específicos,

mediante una precipitación con sulfato de amonio y/o uniéndolos a la proteína de fusión previamente inmovilizada en una membrana de nitrocelulosa, para la proteína de interés. Simultáneamente se obtiene el extracto de proteínas de levaduras transformantes (control y clona) crecidas en medio selectivo sin y con NaCl 1.6 M; las muestras se corren en un gel desnaturante de poliacrilamida (SDS/PAGE) para, más tarde, transferir las proteínas a una membrana de nitrocelulosa. El soporte sólido se incuba con los anticuerpos purificados, la unión anticuerpo-proteína se detecta por medio de un sistema particular que consiste en una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina, etc.) acoplada a un segundo anticuerpo que reconoce la fracción constante (Fc) del primero.

Si se desea conocer la ubicación de la proteína dentro de la célula se puede hacer un ensayo de inmunofluorescencia utilizando un segundo anticuerpo (anti-anticuerpo) marcado, por ejemplo con FITC (isotiocianato de fluoresceína), que reconoce al primero (anti-proteína específica) por su fracción Fc.

Para poder conocer el mecanismo, por el cual este nuevo gen halotolerante ejerce su efecto, es necesario realizar una caracterización bioquímica y funcional completa. El trabajo presentado en esta tesis de licenciatura es sólo el inicio de una labor compleja.

VIII

CONCLUSIONES

Mediante la clonación de secuencias de ADN del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*, presentes en un plásmido unicopia, se aisló una secuencia halotolerante que participa en la tolerancia a cloruro de sodio por su efecto sobre la toxicidad específica generada por el ion sodio.

La salinización progresiva de los terrenos agrícolas es un problema muy grave por su magnitud, extensión y consecuencias, incompatibilidad con la vida vegetal de interés económico. En este trabajo se buscó contribuir con la solución biológica que implica el mejoramiento de especies de interés comercial (tolerancia a la sal) a través de modificaciones genéticas. Para llevar a cabo lo anterior, se utilizó como modelo experimental al organismo eucariota *Saccharomyces cerevisiae*, por las ventajas que ofrece, y se logró aislar una secuencia halotolerante. Con la metodología del ADN recombinante es factible que la secuencia clonada pueda ser expresada, posteriormente, en plantas transgénicas de cultivo para que presenten un fenotipo tolerante en presencia de una elevada concentración de iones sodio.

REFERENCIAS

- Abel, G. H. (1969). Inheritance of the capacity for chloride inclusion and chloride exclusion by soybeans. *Crop Sci.* 9: 697-699.
- Albertyn, J., Hohmann, S. y Prior, B. A. (1994a). Characterization of the osmotic stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: osmotic stress and glucose repression regulate glycerol-3-phosphate dehydrogenase independently. *Curr. Genet.* 25: 12-18.
- Anderson, J. A., Huprikar, S. S., Kochian, L. V., Lucas, W. J. y Gaber, R. F. (1992). Functional expression of a probable *Arabidopsis thaliana* potassium channel in *S. cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 3736-3710.
- Anderson, J. W. y Beardall, J. (1991). Molecular Activities of Plant Cells. An Introduction to Plant Biochemistry. Blackwell, Oxford, 230-232 pp.
- Ashraf, M. (1994). Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 17-42.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. y Struhl, K. (1987). Current protocols in molecular biology. Ed. Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Bakker, E. P. (1993a). Cell Na⁺ and K⁺ transport systems in prokaryotes. en: Alkali Cation Transport Systems in Prokaryotes. E. P. Bakker Editor., CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 205-224.
- Bakker, E. P. (1993b). Low-affinity K⁺ uptake systems. en: Alkali Cation Transport Systems in Prokaryotes. E. P. Bakker Editor, CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 253-276.

- Balcells, L., Gómez, N., Casamayor, A., Clotet, J. y Ariño, J. (1997). Regulation of salt tolerance in fission yeast by a protein-phosphatase-Z-like Ser/Thr protein phosphatase. *Eur. J. Biochem.* 250: 476-483.
- Bañuls, J. y Primo-Millo, E. (1992). Effects of chloride and sodium on gas exchange parameters and water relations of *Citrus* plants. *Physiol. Plant.* 86: 115-123.
- Batie, S. S. y Healy, R. G. (1983). The future of American agriculture. *Sci. Am.* 248: 27-35.
- Beever, R. E. y Laracy, E. P. (1986). Osmotic adjustment in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *J. Bacteriol.* 168: 1358-1365.
- Blomberg, A. y Adler, L. (1989). Roles of glycerol and glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) in acquired osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 171: 1087-1092.
- Blomberg, A. y Adler, L. (1992). Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microb. Physiol.* 33: 145-212.
- Boyer, H. W. y Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *E. coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.
- Boyer, P. D. (1970). The Enzymes, Volumen I, Academic Press, N. Y. 559 pp.
- Bray, E. A. (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103: 1035-1040.
- Brewster, J. L. *et al.* (1993). *Science.* 259: 1760-1763.
- Brown, A. D. (1990). Microbial Water Stress Physiology. Principles and Perspectives. Wiley, New York.
- Brown, C. y Simpson, J. (1972). Water relations of sugar-tolerant yeasts: the role of intracellular polyols. *J. Gen. Microbiol.* 72: 589-591.
- Carmel, O., Dover, N., Rahav-Manor, O., Dibrow, P., Kirsch, D., Karpel, R., Schuldiner, S. y Padan, E. (1994). A single amino acid substitution (Glu134-Ala) in *NhaR1* increases the

- inducibility by Na⁺ of the product of *nhaA*, a Na⁺/H⁺ antiporter gene in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 13: 1981-1989.
- Claes, B., Dekeyser, R., Villareal, R., Van den Bulcke, M., Van Montagu, M. y Caplan, A. (1990). *Plant Cell.* 2: 19-27.
- Clarke, L. y Carbon, J. (1980). Isolation of a yeast centromere and construction of functional small circular chromosomes. *Nature.* 287: 504-509.
- Close, T. J. y Lammers, J. (1993). An osmotic stress protein of cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins. *Plant Physiol.* 101: 773-779.
- Clotet, J., Posas, F., Nadal, E. y Ariño, J. (1996). The NH₂-terminal extension of protein phosphatase PP2I has an essential functional role. *J. Biol. Chem.* 271: 26349-26355.
- Cosgrove, D. J. y Hedrich, R. (1991). Stretch-activated chloride, potassium and calcium channels coexisting in plasma membranes of guard cells of *Vicia faba*. *Planta.* 186: 143-153.
- Costigan, C., Gehrung, S. y Snyder, M. (1991). A synthetic lethal screen identifies *SLK1*, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Mol. Cell Biol.* 12: 1162-1178.
- Csonka, L. N. (1981). Proline over-production results in enhanced osmotolerance in *Salmonella typhimurium*. *Mol. Gen. Genet.* 182: 82-86.
- Csonka, L. N. (1989). Physiological and genetic response of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 53: 121-147.
- Csonka, L. N. (1991). Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 569-606.
- Csonka, L. N. y Hanson, L. N. (1991). Prokaryotic osmoregulation: Genetics and physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 569-606.
- Chandler, P. M. y Robertson, M. (1994). Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45: 113-141.

- Chapman, V. J. (1960). Salt Marshes and Salt Deserts of the World. Leonard Hill Books, Interscience, New York.
- Delauney, A. J. y Verma, D. P. S. (1993). Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4: 215-223.
- Downton, W. J. S. (1984). Salt tolerance of food crops: Perspectives for improvements. *Crit. Rev. Plant Sci.* 1: 183-201.
- Elble, R. (1992). A simple and efficient procedure for transformation of yeasts. *Biotechniques*. 13: 18-20.
- Epstein, E. y Rains, D. W. (1965). Carrier-mediated cation transport in barley roots: Kinetic evidence for a spectrum of active sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 53: 1320-1324.
- Epstein, E., Rains, D. W. y Elzam, O. E. (1963). Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by barley roots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 49: 684-692.
- Epstein, W. (1980). Saline Culture of Crops: A Genetic Approach. *Science.* 210: 399-404.
- Epstein, W. (1986). Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Rev.* 39: 73-78.
- Epstein, W., Buurman, E. McLaggan, D. y Naprstek, J. (1993). Multiple mechanisms, roles and controls of K⁺ transport in *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.* 21: 1006-1010.
- Eraso, P., Cid, A. y Serrano, R. (1987). *FEBS Lett.* 224: 193-197.
- Evans, D. A., Sharp, W. R., Ammirato, P. V. y Yamada, Y. (1983). Handbook of Plant Cell Culture. Volumen I, McMillan Publishing Co., New York. 468 pp.
- FAO. (1971). Irrigation and Drainage. Paper 7, Rome.
- Felle, H. H. (1994). The H⁺/Cl⁻ symporter in root-hair cells of *Sinapis alba*. An electrophysiological study using ion-selective microelectrodes. *Plant Physiol.* 106: 1131-1136.

- Ferrando, A., Kron, S. J., Rios, G., G. R. y Serrano, R. (1995). Regulation of cation transport in *Saccharomyces cerevisiae* by the salt tolerance gene *HAL3*. *Mol. Cell. Biol.* 15: 5470-5481.
- Finkelstein, R. R. y Somerville, C. R. (1990). Three classes of abscisic acid (ABA)-insensitive mutations of *Arabidopsis* define genes that control overlapping subsets of ABA responses. *Plant Physiol.* 94: 1172-1179.
- Flowers, T. J. y Yeo, A. R. (1988). Ion relations of salt tolerance. en: Solute Transport in Plant Cells and Tissues. D. A. Baker y J. L. Halls Editores., Longman, London. pp. 392-416.
- Flowers, T. J., Troke, P. F. y Yeo, A. R. (1977). The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 28: 89-121.
- Gaber, R. F. (1992). Molecular genetics of yeast ion transport. *Int. Rev. Cytol.* 137A: 299-353.
- Gancedo, C. y Serrano, R. (1989). Energy yielding metabolism. en: The Yeast. J. S. Harrison y A. H. Rose Editores, 2da ed., Volumen III, Academic Press, San Diego, CA. pp. 205-259.
- Garciadeblas, B., Rubio, F., Quintero, F. J., Bañuelos, M. A., Haro, R. y Rodríguez-Navarro, A. (1993). Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Sacharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* 236: 363-368.
- Gaxiola, R., Larrinoa, I. F., Villalba, J. M. y Serrano, R. (1992). A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. *EMBO J.* 11: 3157-3164.
- Giaever, H. M., Styrvoid, O. B., Kaasen, I. y Ström, A. R. (1988). Biochemical and genetic characterization of osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacterio.* 170: 2841-2849.
- Gimeno, R. E., Espenshade, P. y Kaiser, C. A. (1995). *SED4* encodes a yeast endoplasmic reticulum protein that binds Sec16p and participates in vesicle formation. *J. Cell Biol.* 131: 325-338.
- Gimmler, H., Kaaden, R., Kirchner, U. y Weyand, A. (1984). The chloride sensitivity of *Dunaliella parva* enzymes. *Z. Pflanzenphysiol.* 114: 131-150.

- Gläser, H. U., Thomas, D., Gaxiola, R., Montrichard, F., Surdin-Kerjan, Y. y Serrano, R. (1993). Salt tolerance and methionine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae* involve a putative phosphatase gene. *EMBO J.* 12: 3105-3110.
- Gorham, J., Wyn Jones, R. G. y Bristol, A. (1990). Partial characterization of the trait for enhanced K^+ - Na^+ discrimination in the genome of wheat *Planta.* 180: 590-597.
- Gustin, M. C., Zhou, X. L., Martinar, B. y Kung, C. (1988). A mechanosensitive ion channel in the yeast plasma membrane. *Science.* 242: 762-765.
- Hanahan, D. (1983). Genetic transformation of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 166: 557.
- Handa, S., Handa, A. K., Hasegawa, P. M. y Bressan, R. A. (1986). Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. *Plant Physiol.* 80: 938-945.
- Hanson, A. D. (1982). Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Ann. Rev. Physiol.* 33: 163-203.
- Haro, R., Bañuelos, M. A., Quintero, F. J., Rubio, F. y Rodríguez-Navarro, A. (1993). Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast. A model for plants. *Physiol. Plant.* 89: 868-874.
- Haro, R., Garcíadeblas, B. y Rodríguez-Navarro, A. (1991). A novel P-type ATPase from yeast involved in sodium transport. *FEBS Lett.* 291: 189-191.
- Heuer, B. (1994). Osmoregulatory Role of Proline in Water and Salt Stressed Plants. en: Handbook of Plant and Crop Stress. Pessarakli M. Editor. M Dekker, Inc. USA. pp. 363.
- Hieter, P. C., Mann, C., Snyder, M. y Davis, R. W. (1985). Mitotic stability of yeast chromosomes: a colony color assay that measures nondisjunction and chromosome loss. *Cell.* 40: 381-392.
- Hoar, W. S. (1975). Fisiología General y Comparada., Ed. Omega, España, 854 pp.
- Hughes, V., Muller, A., Stark, M. y Cohen, P. (1993). Both isoforms of protein phosphatase Z are essential for the maintenance of cell size and integrity in *S. cerevisiae* in response to osmotic stress. *Eur. J. Biochem.* 216: 269-279.

- Jacobson, T. y Adams, R. M. (1958). Salt and stress in ancient Mesopotamian agriculture. *Science*. 128: 1251-1258.
- Jacoby, J. J., Nilus, S. y Heinisch, J. (1998). A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the *SLG1* gene. *Mol. Gen. Genet.* 258: 148-155.
- Jia, Z. P., McCullough, N., Martel, R., Hemmingsen, S. y Young, P. G. (1992). Gene amplification at a locus encoding a putative Na^+/H^+ antiporter confers sodium and lithium tolerance in fission yeast. *EMBO J.* 11: 1631-1640.
- Johnston, M. y Davis, R. W. (1984). Sequences that regulate the divergent *GAL1-GAL10* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 4: 1440-1448.
- Kiyosue, T., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (1994). Cloning of cDNAs for genes that are early-responsive to dehydration stress in *A. thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 25: 791-798.
- Ko, C. H. y Gaber, R. F. (1991). *TRK1* and *TRK2* encode structurally related K^+ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 11: 4266-4273.
- Kochian, L. V., Garvin, D. F., Shaff, J. E., Chilcott, T. C. y Lucas, W. J. (1993). Towards an understanding of the molecular basis of plant K^+ transport. Characterization of cloned K^+ transport cDNAs. *Plant Soil.* 156: 115-118.
- Kovda, V. A. (1980). Problem of Combating Salinization of Irrigated Soils. UNEP.
- Kovda, V. A. y Szabolcs, I. (1979). Modelling of soil salinization and alkalization. *Agrokem. Talajtan.* 28: 294-303.
- Kyte, J. y Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157: 105-132.
- Lages, F. y Lucas, C. (1995). Characterization of a glycerol/ H^+ symport in the halotolerant yeast *Pichia sorbitophila*. *Yeast.* 11: 111-119.

- Larher, F., Leport, L., Petrivalsky, M. y Chappart, M. (1993). Effectors for the osmoinduced proline response in higher plants. *Plant Physiol. Biochem.* 31: 911-922.
- LaRosa, P. C., Handa, A. K., Hasegawa, P. M. y Bressan, R. A. (1985). Abscisic acid accelerates adaptation of cultured tobacco cells to salt. *Plant Physiol.* 79: 138-142.
- Larsson, K., Ansell, R., Eriksson, P. y Adler, L. (1993). A gene encoding sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD⁺) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 10: 1101-1111.
- Latterich, M. y Watson, M. D. (1991). Isolation and characterization of osmosensitive vacuolar mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 5: 2417-2426.
- Latterich, M. y Watson, M. D. (1993). Evidence for a dual osmoregulatory mechanism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 191: 1111-1117.
- Lauer, G. O., Roberts, T. M. y Klotz, L. (1997). *J. Mol. Biol.* 114: 507.
- Leigh, R. A., Ahmad, N. y Wyn Jones, R. G. (1981). Assessment of glycinebetaine and proline compartmentation by analysis of isolated vacuoles. *Planta.* 153: 34-41.
- Leigh, R. A. y Wyn Jones, R. G. (1985). Cellular compartmentation in plant nutrition: The selective cytoplasm and the promiscuous vacuole. *Adv. Plant Nutr.* 2: 249-279.
- LeRedulier, D., Ström, A. R., Dandekar, A. M., Smith, L. T. y Valentine, R. C. (1984). Molecular biology of osmoregulation. *Science.* 224: 1064-1068.
- Lerner, H. R. y Amazallag, G. N. (1994). The responses of plants to salinity: A working hypothesis. en: *Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants*, J. H. Cherry Editor, Springer-Verlag, Berlin. pp. 463-476.
- Levitt, J. (1980). Responses of Plants to Environmental Stresses, volumen I, Ed. Academic Press, New York, 285 pp.
- Lone, M. I., Kue, J. S. H., Wyn Jones, R. G. y Bright, S. W. (1987). Influence of proline and glycinebetaine on salt tolerance of cultures barley embryos. *J. Exp. Bot.* 38: 479-490.

- Lucas, C., Da Costa, M. y Van Uden, N. (1990). Osmoregulatory active sodium-glycerol co-transport in the halotolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *Yeast*. 6: 187-191.
- Lloyd, M., Kaiser, R. J., Hughes, P. Dodd, C., Conell, C., Heiner, C., Kent, S. y Hood, L. (1986). Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* 321: 674-679
- Mager, W. H. y Varela, J. C. S. (1993). Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.* 10: 253-258.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. y Sambrook, J. (1982). Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1982.
- Marcusson, E. G., Horazdovsky, B. F., Cereghino, J. L., Gharakhanian, E. y Emr, S. D. (1994). The sorting receptor for yeast vacuolar carboxipeptidase Y is encoded by the *VPS10* gene. *Cell*. 77: 579-586.
- McCue, K. F. y Hanson, A. D. (1990). Drought and salt tolerance: Towards understanding and application. *Trends Biotechnol.* 8: 358-362.
- Mendoza, I., Rubio, F., Rodriguez-Navarro, A. y Pardo, J. M. (1994). The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269: 8792-8796.
- Metzler, D. E. (1977). Biochemistry. Academic Press, New York. 636 pp.
- Meyerowitz, E. M. (1989). *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell*. 56: 263-269.
- Miller, J. H. (1972). Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratories, NY. 421 pp.
- Munns, R. (1993). Physiological processes limiting plant growth in saline soils: Some dogmas and hypotheses. *Plant Cell Environ.* 16: 15-24.
- Munns, R. y Termaat, A. (1986). Whole plant responses to salinity. *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 143-160.

- Murguía, J. R., Bellés, J. M. y Serrano, R. (1995). A salt-sensitive 3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase involved in sulfate activation. *Science* 267: 232-234.
- Nakamura, T., Liu, Y., Hirata, D., Namba, H., Harada, S., Hirokawa, T. y Miyakawa, T. (1993). Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J.* 12: 4063-4071.
- Nasmyth, K. y Reed, S. I. (1980). The isolation of genes by complementation in yeast: the molecular cloning of a cell cycle gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 2119-2123.
- Nguyen, H. T. y Joshi, C. P. (1994). Molecular genetic approaches to improving heat and drought tolerance in crop plants. en: Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants. J. H. Cherry Editor, Springer-Verlag, Berlin. pp. 279-289.
- Nieman, R. H. y Shannon, M. C. (1976). Screening plants for salinity tolerance. en: Plant Adaptation to Mineral Stress in Problem Soils. M. J. Wright Editor, Cornell University, Ithaca, NY. pp. 359-367.
- Novick, P. y Botstein, D. (1985). Yeast actin mutants. *Cell.* 40: 405-416.
- Panaretou, B. y Piper, P. W. (1990). Plasma membrane ATPase action affects several stress tolerances of *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe* as well as the extent and duration of the heat shock response. *J. Gen. Microbiol.* 136: 1763-1770.
- Petes, T. D. (1980). Molecular genetics of yeast. *Ann. Rev. Biochem.* 49: 845-876.
- Piatkowski, D., Schneider, K., Salamini, F. y Bartels, D. (1990). *Plant Physiol.* 94: 1682-1688.
- Pilon-Smits, E. A. H., Ebskamp, M. J. M., Paul, M. J., Jeuken, M. J. W., Weisbeek, P. J. y Smeekens, S. C. M. (1995). Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.* 107: 125-130.
- Posas, F., Bollen, M., Stalmans, W. y Ariño, J. (1995). Biochemical characterization of recombinant yeast PPZ1, a protein phosphatase involved in salt tolerance. *FEBS Lett.* 368: 39-44.

- Posas, F., Camps, M. y Ariño, J. (1995). The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J. Biol. Chem.* 270: 13036-13041.
- Posas, F., Casamayor, A. y Ariño, J. (1993). The PPZ protein phosphatases are involved in the maintenance of osmotic stability of yeast cells. *FEBS Lett.* 318: 282-286.
- Rains, D. W. y Epstein, E. (1967). Sodium absorption by barley roots: Role of the dual mechanisms of alkali cation transport. *Plant Physiol.* 42: 314-318.
- Ramos, J., Alijo, R., Haro, R. y Rodríguez-Navarro, A. (1994). TRK2 is not a low-affinity potassium transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 176: 249-252.
- Rine, J., Hansen, W., Harderman, E. y Davis, R. W. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 6750-6754.
- Rose, M. D., Novick, P., Thomas, J., Botstein, D. y Fink, G. (1987). A genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. *Gene* 60: 237-243.
- Rothstein, A. (1984). Membrane function and physiological activity of microorganisms. en: The Cellular Functions of Membrane Transport. J. F. Hoffman Editor, Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ. pp. 23-39.
- Rudolph, H. K., Antebi, A., Fink, G. R., Buckley, C. M., Dorman, T. E., LeVitre, J., Davidow, L. S., Mao, J. y Moir, D. T. (1989). The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in *PMRI*, a member of the Ca^{2+} ATPase family. *Cell.* 58: 133-145.
- Rush, D. W. y Epstein, E. (1981). Comparative studies on the sodium, potassium and chloride relations of a wild halophytic and a domestic salt-sensitive tomato species. *Plant Physiol.* 68: 1308-1313.
- Sanders, D. (1980). The mechanism of Cl^- transport at the plasma membrane of *Chara corallina*. Cotransport with H^+ . *J. Membr. Biol.* 53: 129-136.
- Sanders, D. y Hansen, U. P. (1981). The mechanism of Cl^- transport at the plasma membrane of *Chara corallina*. Transinhibition and the determination of H^+/Cl^- binding order from a reaction kinetic model. *J. Membr. Biol.* 58: 139-153.

- Schachtman, D. P., Schroeder, J. I., Lucas, W. J., Anderson, J. A. y Gaber, R. F. (1992). Expression of an inward-rectifying potassium channel by the *Arabidopsis KAT1* cDNA. *Science* 258: 1654-1658.
- Schuldiner, S. y Padan, E. (1993). Na⁺/H⁺ antiporters in *E. coli*. en: Alkali Cation Transport Systems in Prokaryotes. E. Bakker Editor, CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 25-51.
- Selye, H. (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138: 32.
- Selye, H. (1973). The evolution of the stress concept. *Am. Sci.* 61: 692-699.
- Sen, D. N. y Rajpurohit, K. S. (1978). Plant distribution in relation to salinity in Indian desert. en: Second International Congress of Ecology. Jerusalem. 340 pp.
- Sentenac, H., Bonneaud, N., Minet, M., Lacroute, F., Salmon, J. M., Gaymard, F. y Grignon, C. (1992). Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system. *Science* 256: 663-665.
- Serrano, R. *et al.* (1986). *Nature* 319: 689-693.
- Serrano, R. (1989). Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 61-94.
- Serrano, R. (1990). Recent molecular approaches to the physiology of the plasma membrane proton pump. *Bot. Acta.* 103: 230-234.
- Serrano, R. (1991). Transport across yeast vacuolar and plasma membrane. en: The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Genome Dynamics, Protein Synthesis and Energetics. J. R. Broach, J. R. Pringle y E. W. Jones Editores, Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, NY. pp. 523-585.
- Serrano, R. (1994). Yeast halotolerance genes: Crucial ion transport and metabolic reactions in salt tolerance. en: Biochemical and Cellular Mechanisms of Stress Tolerance in Plants. J. H. Cherry Editor, Springer-Verlag, Berlin. pp. 371-380.

- Serrano, R. y Gaxiola, R. (1994). Microbial models and salt stress tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 121-138.
- Shannon, M. C. (1982). Genetics of salt tolerance: new challenges. en: Biosaline Research- A Look to the Future. A. San Pietro Editor, Plenum Press, NY. pp. 271-282.
- Sheahan, J. J., Ribeiro-Neto, L. y Sussman, M. R. (1993). Cesium-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 3: 647-656.
- Stocker, O. (1926). Halophytic plants. *Ergeb. Biol.* 3: 265-354.
- Struhl, K. (1983). *Nature* 305: 391-397.
- Szabolcs, I. (1989). Salt-Affected Soils. CRC Press, Boca Ratón, FL.
- Tarczynski, M. C., Jensen, R.G. y Bohnert, H. J. (1992). Expression of a bacterial *mtlD* gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89: 2600-2604.
- Tarczynski, M. C., Jensen, R.G. y Bohnert, H. J. (1993). Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolite mannitol. *Science* 259: 508-510.
- Timasheff, S. N. y Arakawa, T. (1989). Stabilization of protein structure by solvents. en: Protein Structure: A Practical Approach. T. E. Creighton Editor, IRL Press, Oxford. pp. 331-345.
- Vallejo, C. G. y Serrano, R. (1989). Physiology of mutants with reduced expression of plasma membrane H⁺-ATPase. *Yeast* 5: 307-319.
- Van Zyl, P. J., Kilian, S. G. y Prior, B. A. (1990). The role of an active transport mechanism in glycerol accumulation during osmoregulation by *Zygosaccharomyces rouxii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 34: 231-235.
- Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A. y Ballester, R. (1997). A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *S. cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 13804-13809.

- Ward, A. C. (1990). Single-step purification of shuttle vectors from yeast for high frequency back transformation into *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 18: 5319.
- Watanabe, Y., Sanemitsu, Y. y Tamai, Y. (1993). Expression of plasma membrane proton-ATPase gene in salt tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii* is induced by sodium chloride. *FEMS Microbiol. Lett.* 114: 105-108.
- Wilson, T. H. y Lin, E. C. C. (1980). Evolution of membrane bioenergetics. *J. Supramol. Struct.* 13: 421-446.
- Wyn Jones, R. G. y Pollard, A. (1983). Proteins, enzymes and inorganic ions. en: Encyclopedia of Plant Physiology. New Series. A. Lauchli y A. Pirson Editores, Volumen 15B, Springer-Verlag, Berlin. pp. 528-562.
- Yamaguchi-Shinozaki, K., Koizumi, M., Urao, S. y Shinozaki, K. (1992). Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *A. thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 33: 217-224.
- Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D. y Somero, G. N. (1982). Living with water stress: Evolution of osmolyte systems. *Science* 217: 1214-1222.
- Yashiroda, H. y Mann, A. F. (1996). Bullp, a new protein that binds to the Rsp5 ubiquitin ligase in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 16: 3225-3263.
- Yeo, A. R., Lee, K. S., Izard, P., Bousier, P. J. y Flowers, T. J. (1991). Short and long term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 42: 881-889.

APÉNDICE I

Secuencia de Nucleotidos del Inserto de 10 kb

CAGATCCTAAAATAGTGAATGCCTCTTGCTTACTAACATCTTGACCATACGGGAATTTTGCCT
CGGCAAACCTCAGTACCATCAATAGTTACATATGCCCTCAACTCATTGTCTTCATGAGGTACGG
CAACAATAATATAGCCACCAGTGGACAAGTAGCCGATAATGTTTTCAAAGATAATTTTATTAT
CACCTTGGAAAAAATCTATCGAAGAAACCAAGCTTCTTGTTTCTGAAGACTTCTTTTTTACTT
GGCACATAACCATCTCCTCATTTGACGGATATTCAAAGAGTGTGCCTGCAAACCTCACAATGAA
TTGCATTATCAAGCATTCTGTAAAAGTTTACCTCCATCTTTGGTGAGGTATGCTACTGCAT
GACATTCTGGACTTAAGATTGATTACAAATTCTTGCCACCATAGTAAATAAAAGTATCCTGTG
CTTTAGCACTAAAATCTAGTGGCATACTAATTGCCCTGGCTTACAGTAATTTAGCTATCATAA
AAGAGTGTCTCTATCGTGTGTTGAGAATATGTTACCTTTAGAGCCAAACAAATATGCTGAAG
AATTGAAATATGGGTAAACACAACCTCAACAATTTTTTCGCCGTTAGTGTCAAACCTTTTTA
TTGTTTGTCCACCATCGTGGGATATATAGGCGTCTCCTATCGAATTCAGCATGACCAAAGATT
CGTCGGCAAACGTATCGAAGTATTGGTAAAATTTAATTTTCGAAGTCAAATTTGTTTTCAGTGG
TCACATTTTCCCTGTCACTCGAACCCCTCTGGAATTTTCGTACACCGGAATATCAACGGGTT
CAATTTTCATGGGTGTTTTACATTCATCACCTTTGATTAATTGTAATGGCTCTACTAACACAG
ATTTATCCTTCGATTTGTACATATGTTGGAAAAGGCAATCAGATTATAATCTGGTATACACA
GGCCGTTTGGCTCCCTAACAAATTCAAACGAACATTCGTAGTCGGATTCACCACAACATTAC
AAGCGGTTTCATCTAAACTCAAATCTTTGAATGCTTTTTTTTACCAAACACTGGGCGTCTGTT
TCCTCCTTCTATACTTGTATTTGGCGCCATTAACACATTTCCCATCCGCCAAATCCCAATCTT
CAAAATCTTCCCTCCTCACACGTTCTAGAGTCTGAATGCTGCTGAAAAATCAATTATATACTCGA
CACCTTTTAAAGAAGTTATACTGTTGGTTTCGGAATCGGTAGTGGCAAACGTTCTTTTAAAAA
TAAATTTTGAGCCAGATCCATCTGGTGTGGATTATCAATTTGTAGGATGGACAGAACTTA
TGGCATTGGTCAGCTCATATTCATTCCATGTTCTACCTTGGTCCAAGAATAATAAAATTCAG
ATTGAAAATCGCCATCTTCCCTCTGGATCATATGGGATATACACAATAATATTTCCAGGTCAC
CAGTAGCATATAACCCAGAAGAATTATGAACAAATCTCCACGTTAAACCGCCATCTCTAGAGA
TGAAAGTTTTTTGGTCTTCCCAATCGAATTCACTACCCTCGCCAACGGAACTGTCAATTAACA
TAATTCGGGCAGTAGGATTTGAGATTTAGATACTATAAAAAGGGTTCTGGAGCGAACATCTTT
CAGGCCTAGTGATATCACAAAGGAATGAATCTGCATTTTCCCTCGTCAACCACTTTCAAATTTG
ACCATGTGAGGCCGTTATCAACAGATATTTAGTTTCATATCTGGCTATCTTTTTATTATATT
TTCCTTTGTTATGAGAGTAGTCAAAGGAAGGATGAAACGAGCCAATTATTGTTCTTCTAAGA
AATGAGGAGAAGCAATATCAATATAACCAAAGTGAGGATTTATTGTCCATTCAACAGGTAAAA
ATTTCAACCCCTTGAGAATCTGATATTAATAATTTCTGAGGGAGCTGGTTGGTCTTTTTTTTCAT
CTGTGAATATCGTAGATATAGGAATGATTATTCTTCCAATAGAATCTTCATAAATTCATACA

TATGGACGTGCCGTACTTGAGCAGGTAGACGTGCCTTTTAAAAAGTAGACGCATCATTGGATA
TCCAGATGTCCATGGGTGACATTTTCATTGTATCTATCATCTTGTGTGCGAAACGATTATATGTG
ATTTTAATATCTTGTATTGATAAATAATTTTATCATTAAACTCATCAAATTTTTTGAAGTTT
TACCTCCATCAGTACTTAAGGCTAATTGTGTATATGCGGCACCTAAGTGACGATCGCTATCGT
AACCATGGTTCGAGAACAAACATAGTATCGAAGCGTCGTTACCCTCAATATCAGAATCCTTGC
TAGATTTGACAAAGTTGCAGCTTGAACCTGTFATATGGTCATCTTCTTTCTTTTCAAGGAAG
GTTTCGATATTGTAAAAGGATTCCCCATCGTTGGTAAAGTAAGTTTCATTTTGTATTTGGATAT
AACCATGTTCGTTTATAAAGCAAGGGCAATCTGCAATAAGGTACTTTTTATCTGTCCGGATGGG
TAGCTATAGAGCAAGAAGTACCCAAACGACAGTTTTTCAGAGACGGGTATAGTCAGAGCCCTCC
ATGATTTTCCACGATCATCGGTGACGTAATAATTTGGGTGATAAATGTATCGAAACAAAAGCCC
TGTCTGTCCATGCAAAGGATCAACAATTAATTTCGAGAATATGCCCTTCAATTTCTTTGACCG
CTTCCCAATTTCTCCAGAATCGGAACCTTATCCACACGACTTGATTATCTAATCTGATTAAC
TGTTGGAATCGTCAAAGCTCTCTAGACTAAATGAATATTCTGAAAGAGTCTCCGTTACTTTGG
GGACGAATTCCTCTGCATTGAGTAACGGAATAAAGAGACATGTCAAATCGTGCATATGACTT
GGAGTAATATCATAATTGAGGATCTCTTACCTTTTCTTAGTTCAAAGCTTTTTTTCAAAGCTC
GGAACTTTATGCTACGATTCAATGACTAAAAAAAAGGTAGCGGATAATCTTTTGGTTGCAAT
TGGCGGCATTTAAATATATTTTGGGTTGCAAATATTCTAAAAATATTCTCATAATATTCTAAA
AATATCTAGCCTAGGTAATTGCAATTATTTGAGTCTGGTTATTTGAGTTGACCATGTTCCAC
TTCCTTTTCAGTCATCAAGACAACGTGTTTACCATCTAATGGGGAATCAAACAGATAAAACTA
GAAACTGAGCAAAAATACTTTGATTTGCTAATGTGCGCCAGTAGTACGATAATACTATAAAGAT
ATGCTGTTGAAGCTGATATTTAAAGAATGAGAATCTCTAAGGGATCATAGTCTAGAATGGTAT
TCTGCAAAACAAATTTTAAATGGTGAAAACCTTTTCTCACTATGTCCAATTGATGCTTCTTAG
GATGACGTTAGAATTTTATTTAGTGCAGGCATTACCTTGCTAAGTTCATTCATTAAGTACT
AATATACCTTACTGGCATGCATTTACCTAAGTGGTCTCCGTTAGCCGTGGTCTTTTCGAACGC
AACAACTTTCAAGTTAAGTAAAAATGATTTATTTCTATAAAATATGTATGTAGTGGGAAAGACT
CGACAGACCTGCTTGCCAAGTTCTCTTTCTAAGCAATTGAGTTGGCCAGTCCCCCTGAAAATG
CTAATGCCCATGTGCGACTCATTCCGTTATCCAAATATGTGGATGAATCAAAGTTGAATCAC
TGAAAAATGCATACGAATCTACTGGGTGCAAGAGTGCTTGATTGAGCTTCAATATGCCTGTCC
AGCCGCTTTCTATCGATTCAATAATTGGCTCGATTTTAGTCTGCCATTCTTCTTCGACGAAAG
TCTCAGAACGAATATTAGAAGAACTGGTGTGATAGGTAGCATATGAATACCGTGGATATATT
CTGTGTTTGTTCAAAATAAGTAGTATAATCGATAATATTATCGAATAAAATACCATCACTTT
ATTTCCATGATTTCTTCAGGCTCAACTGTGTTGTCATTTTGATAATAGAAATAGTCGTTTCAT
TGCATCCTTCATTATACTAATCATCAAGTCACCCCTCAATTCATTGACTGGTCACCGATAGT
GGCCCCCATAACTTCATAGCATAGGCAAAATGTAAATCTTCACTACTACTTTCTTCGTTCTT
ACCGTTACCGTTTTTCATAAAGTCCAGCTGCCCATGAATGACCGTTGAACCAATCAAACATTCT
CGATTGTGCAAAGTATTCATCTTTTTCAGATGGATTTGCGACATCTCTTACCAATGAATTGAC
CCAATCTTTATTGTGCGCAGCCCAAGTACCATTTCAGTTTAGAGTCAACATAGCCGATGACAGC
AGCTGCATGAATAATGTAACCATAATGGAATGATGGTCATTGTAATAAGTGTACCAAATC
GTATTGCGTGCTGGTGAACCCCAATCTCCTGAACTGACCAAACCGTTGAACTTTGTGTGTA
AATTAGTGGATACGTCTGTTCAATTTGTAGCAGAATATCAAAGGCCGATTTGATGTTTTCCAA

AGTACTCTTAGTACTGGCTTCATCTTGGATGATTTCCGGAGACCGTTAATAGAATGTAAGAATA
CTTATCGATAACTTTACCCAAATAATATGTGTTAACC CGCTTATACTTTCCGAAATACTAAC
CTGTAATTCGGAATTGGCAACTTCAGCTAATAATTGCAATTGTTCTTTAGAATACCTAAAAG
GTTTGAGCCAAGTTGAGAAGACCATGGTAACCAAGATATTTGTCTGTTTAGAGATGTGGAAAA
TTGTAGGCTCGTTGTTAGATAACCGTTTCATTACACCCTTAGTTGTAGAAGCGAGTTGAATGCC
GGTATAGTAGTCTTGCATTATATCACTAAATGAAGATTCATGATGGGGCAAGGCCAAAAATCAT
TGTGCTACCTGATGCCGACTCACCTTGGGTGGTATAAGAAAATTCATAGGTAGCTGTAGAACC
GTGAGAGACACCCTGCAGCTTGAAATTAGTAACGTACATACCTGCCGCTTGATCATAAAAGAC
CTGTAATCAGTTTCAGAAGGTGCGACGGCCAATTGAATGATAAGACCATCAACACTAGCGCT
TGCTTTAATTTTCATATTCTGAGCTCACCTCCAATGAAAAGTCCGTTGAGGTTAAATCGTCTGG
TCCTATCACGTAACATAACAAGTGACTCCATTCAAAGGGTGATACGATATTTGAGAATACCC
TGAGCTAAATTGCTTGATGATTCAGAAAACATGGTATTGAATCCGACGCTGGAACCAATCTTG
GCATTTAAAGATCCATGATATATACCAGTTGCAAATCCCATACCTTGAACCAAAGGTATTTCC
AGGTAGTTCGAAGAATCATTGGATTCTGATAGCACTACCCTTGTGGAAGACAAGTTCATTTCA
TCAACTTGCATAGTCATACTTGAATCAAATTCGAAGCTGAGAAAACAACATGAGCAATCCC
AAAGGATTGACCAAATATTCTGCATTACCGAAGTGTACATAACCACCGTAGCTATATTGATCT
ACTGTTGTATGTTGAACAGCAAACCATATGAACTCGAGGTGTACTCCACAATGAATAAGGA
TACACAAAGGCAGGTGATTCTGACTACCAACAATCAAATTTGTATAAAACTTGTGTTTGA
ATGGGACCATCGTTTGACACCCCATCAGCCAATGACATAGGATTTGGTGATCTGTCAAAAACA
GTTGGTGGTTCATCTGTGAAACAGCATTGAAAAGATTGACAATGGTCTGTTGTTGAAGAGTTC
TCCGTTGTGGTAGCGGTGCTACTGGTTCGAGGTTGACAGAGAAGAGGAGGAAGTTTTGTTTGT
CTCGAAGATGAGGACGAAGAGATGGTAGCTTGCATTGAAGAAGATACATAAATGGTATCTAAT
GTGGAAGAAACCGGAGAGGAAGAAGAAATCTACTGTTGAAAATAGTGATGACAAAAGAATGTTT
CCTGTTGAACTCGATGGATAAACTGGACTAACAGTTCGATGATAGTGATGGTGTGGTGAAGAA
CCGTTTTCTGTAATGTTTGAAGGGTAAATGGACTAGTTGTGCAATATAGTGATACAGATGGA
GAAAGAGTGATTTGTGTCCTATTAGATGGGTAAGCAGGGCTTGTCTGTTGTAGATGCGAGCGTC
TGGACTAAATCCTGGGTTGAGTTGGATGGATAGAACAAAGTCGAGGAAGCAGGAGTTGAAGCA
ATGAAGGAATCTTCGCCGTAGCTGTAGCTGCATTTGTCTTACTGAAATAGTATATATCGTT
TTATTCGAGGTCAATGAAGAAGGAATAATTTTTGTTTCTTGGGAAGAATAGGAAGGCATTTGA
GTTACCAGTGGATCGATTGTACCTTTTGAACAGAAGTCAATAAAGTTCATTTAATTGTGTC
CCCGAAATAGATAAAGATGAAGAAAATAAAGTCGAAGTCGAAGTCGAAGCAGTTTGAGATAAT
AATGTGGTGACTTTACGCATTGTTGATGCACCTGGCATGACTGAGGCGACGCCGAAACCGAA
CTCAAATTTGTGACTGAACTTTTGCTTTTTCGAATTATCATTTGCGTAAATATTTGAAACAGTG
ACAGGATCATTATTGGTTTGTGCGCTTATTTTTGAGATACTTGGCTTGCCTAGTTTGATAAC
GACAATGACAGTTGAACTGCTGTTCTTGTATTAGAATCACTGTCTTGTGAATTAATTGGAGAT
GCGCTCACTCTATTTTTGGCGAAACTGAGAGAGGGCTATGAGAAGCTGCAGATACTCTTGTT
ACAACCACCGATTGTGCAACATAAGGCTCACCTACTGTCAAAGTAGCGTAAGATAAAGTTTCA
ATTAATCAGTTTCCAATATTTCTGCTGCATTATTCGATATGAAACTTATATATGAACATTCG
ACGAAACTTAATAGAAAAGAAGTGTGAGATATAATTGCATACTAGCTGTTTTTTTTGTTTTCT
TTTCTGTATGCAGACCGTTACTATGGTTATCTACTTGTGTTGAAACAAGCACAAGAAACATACTT

GATATTCATTTTTGAAACAAATTGCACCAAGTATTTATATGTAGTCCTTTACCCTCGCTTGTA
GTCTTCGTATGGTGTATATGCTTTGCTACTCTTTTCATACCCAGCTCTTATTTTTAACTTTTT
GGTTCAGCTTTATGATTAAGTAGTTTTTCCTTGGTAACCAAATTGGGAGATTCGTGCCTTT
TCTGCTGGCTTTCATAACAAAATATAGCCGAAAAGAGCTTAGCGCAGCTGAACTCGGTAACAA
GGTTCAGGTAAAAAGGGGAGAAAAAAGAAAAGAAAGCCAGATCTTTCAAAAATATGCCAGCA
AATACCAAATTGGTCATAAAATAGCTAGCACTCCGCTATCGAGCAAGTCTCTTGGCAAGCAG
GCTTATTCATTCTTTTGTGTAAGGAAAGGCCAGTTCATGCTTATAACCTTAAGTAGGAAAC
ATATGGCAGCTTACAGCGCATAAAATTGATGGCAACCCATTTAGTGGTACTATTCTCGCCTT
ATTACTAGTATGGTCGCTTTAAAGAGTGGTAAGATTTACATTTTTCAAACTTAAAAAGCAAAG
TTTATCACTTGAAATGTACCTCTCTGTGGGCTTTCACTACCTGTACATTTTCTTAGCAGTTC
CGTACATTTTTTTAAACAATGAAAATTCAAAAGTTCATGTATAGAGATTATTTAGGTTTTTAG
TACTTAAAGTATTTTGAGAATACCTTGGCAAACGCAGAACAATCGTAAAAGAGATTGCTACTG
CGCACTGTTTCCCTGCTTTATCACTTTCAGTTCGCAAGAACTAAGGTGTTTATCAGTAATGA
TACTGTAATATCAATAGCGATAAAAACCTCGTCAGTGAAACCATTTCTTTTTAACAGCCATCTA
TCAAATAAAAGAGTTTTTAACTTGAAGTGGGATATCAATTCAGCAGATCCAACACCTTTATC
AAAATGAAGTTTTACGCGGAGGAAATATGACCTCGAGCATAAACAACCTTCAAACTTGGCAC
TATGGTAGCTTTAAAATCATCATTATATTTTATATTCAATAACAGTGTCTCTTATACTCAGT
TGAAGTGCCTGATTCCATTCATTTGATTTCCGATGTGAAAAGTACCGAATGGTGATAGTTTGA
TGGGGAGGTTTTTTTTATTCCTAGAAGTTCGAGGAATTATGCTGGATATAGGAGAAGAAGCAAC
AGGCACACTTTTCTCTCCAACCAACTTCGTTTTCAACGCATTTTTTCATGACAACAACATTGGC
TTCCATATTGGCTAAAACCTGTACGTCCTTAATTATACTCGAAGGCATTAATCAGAAAAATC
GAGCGATCTATTACGCAGGCTAGCTCTTGCGTCATCGGCAAGAAGTAAGTTATTTTTGTTTG
ATTTTTAGTGAAGTCACTCGGATATGCTTCAATGTTTTCCAAAATTTCCTTAAATATTTTTCTT
AATTTCAATGTATTTGTGCTTCTTTAAAAGTAAATCACTGTGGAACCTCACTGGTTTGAATC
TTTTGTGTTGCTTTGTTAAGCAAATCAATCCGCTCTCCAGACTACTGATTTCCGGTGGGTGATG
TGGAATACTATTAGCAGCTTGCATACATACTAGTTCAAGCCGTAATTTTTCTAGTTTTTCTCT
CTCTTCAACGGACAATAGACCTCTTAAATAGTCCAGTTCCTTTGATTCTGCCTGTTTCTCAT
TGAAAATACATTTTTGTTTTGAATTAGATTTGGACACCAATATGGCAAAGCATTACTAGGGGG
CTTTATTTTTATTGTTATAAGCCCAATTTTCTCTGAGTAGTCTTTGAAGTGGGATCATCTGG
TTGAGATGAAGGAATATTACGCACACTTTTGAGAAACACATTTTTCAGACCTGTGTTGAAGAG
AGATGCTATAGAGTAAGTAATTTAGTTTGAATTTATCTTCTTCCAGACTAGTGTTCCTTTT
AAGTGTCCGTTTTTCAATTTCCAGCTACCGGTTCCATTCATACTTACCTCTTAGGGGTGA
TAGTTGATCAGAGCGATTCCGCTCCTGTATGTCCTCCTTATGAATGGGAATCGCTCGCTCTAT
TTTAGAAAAGACTTTTTCGATCATTCCAAGCCTGTTTGCAATTTCAATATCGAAATCCTCTAA
GTCTTTGAGGCACTTCTCCCTACTAATTGGATTGTTTTGAAAGCCAAATGGAACATCCTTAT
GCTATACTTTTTTCACTCATTAAACAACACGCCGAGAAGCTACGCTTTGCTACTATCAT
AGCATTATTTAGTAATTTATTAAGCTGCCACTAGAAGTGTGTTAACCATAGTGAGGAACC
TCTTTCTGACAAACGACCATAACCTAAACTCTCCGAAAATTTAGAGTAGAAAGCTCTGGATG
AGAAGTGCATGGTCTATCAAACCCTAATGTAGGGGGCAAAGAGAGTGAGAGAAGTGACCGTG
CTTACAGGTTACGTCTAATAACTGGTTCGGAATTTTAAAAGTAAAAATTTCTACGTTTTATC

ACCTGGATTTAGTATCCTGCTATTCGGTAATCCAAAGCTTGTTTTATCAATGGAGTCAAAAAA
TCCACAAAGGTCTTCCCCGTGTTACGCTCTCATGATTATATGACCAACTCGCTGCCATATC
TACCATTCTCAAATTCCTTCTGTCGTTTTTTGGATTCCAAAGGGTACTGTGTTTTTGAAC
TGTCGTACCTTCCAAAGTTAAATAAACATATCGAATTTTATAGGTTTGGTTGATTTGTTTT
TACAGTAAAATAACCGTGAATTATATCCCCAGAGGTGATTCCCTTAGCATGCTCTCGTGTT
AGGAAGCTGTCCAAATTTTGGAGCCGTCTTTGTGACGTACAATTCAGTCGCTATGGGGTTTT
AATCCTAGGCAATGCGTATATATTCTCAACTGGGATACCTTTA

APÉNDICE II

Diagrama de Flujo del Método Experimental

