

**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**Caracterización funcional de una dehidrina SK₃
aislada de una biblioteca de cDNA de *Opuntia
streptacantha***

Tesis que presenta

Ana Erika Ochoa Alfaro

Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Codirectores de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler

San Luis Potosí, S.L.P., Mayo del 2011



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “**Caracterización funcional de una dehidrina SK₃ de una biblioteca de cDNA de *Opuntia streptacantha***” presentada para obtener el Grado de Doctor(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Ana Erika Ochoa Alfaro** y aprobada el **13 de Mayo del 2011** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont
(Codirector de la tesis)

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler
(Codirector de la tesis)

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís
(Asesor de la tesis)

Dr. Sergio Rosales Mendoza
(Asesor de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos y Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont y la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. Registro 162509) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 032 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 23 días del mes de mayo del año 2011, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís	Presidente	IPICYT
Dr. Sergio Rosales Mendoza	Secretario	UASLP
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Sinodal	IPICYT
Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustentó la C.

Ana Erika Ochoa Alfaro

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización funcional de una dehidrina SK3 aislada de una biblioteca de cDNA de Opuntia streptacantha

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:50 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 23 días del mes de mayo de 2011.

Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

Dr. Marcial Borjilla Marín
Secretario Académico



Dedicatorias

A Dios:

Por darme la oportunidad de vivir cada momento y permitirme crecer como persona y profesionista.

A mis padres:

Martha Evangelina Alfaro de Ochoa

Manuel Antonio Ochoa Cordero

Por su amor, comprensión y apoyo incondicional constante que me han brindado para seguir adelante en la vida.

A mis abuelos:

Lamberto Alfaro García (†)

Ninfa Rodríguez de Alfaro

Ana María Cordero de Ochoa

Por su amor y por aquellos momentos de fortaleza que han sido un ejemplo a seguir para mí, frente a las adversidades.

A mis hermanos:

Martha Lizbeth

Manuel Antonio

Por su apoyo incondicional y por aquellos momentos compartidos.

A mi novio:

Noé Gamaliel

Por el tiempo que hemos compartido.

Agradecimientos

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont por haberme permitido trabajar en su grupo de investigación y por su colaboración y asesoría para la realización de este trabajo.

A la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler por su colaboración y orientación para la realización de este trabajo.

A los Drs. Ángel Gabriel Alpuche Solís y Sergio Rosales Mendoza por sus aportaciones y por su tiempo para la revisión de la tesis.

Al Dr. Oscar Ruiz del INTECH, Argentina, por permitirme realizar una estancia en su laboratorio y por su apoyo.

Al Dr. Joel Flores Rivas, por su contribución en el trabajo de germinación.

A los Drs. Andrés Rodríguez, Santiago Maiale y Fernando Pieckenstain del INTECH, Argentina, por su asesoría técnica durante mi estancia.

A la M.C. Alicia Becerra Flora por su apoyo técnico durante mí doctorado.

A mis compañeros del Laboratorio No 7: Aída, Alicia, Azucena, Betty, Fátima, Israel, Jorge, Luz, Margarita, Silvia por su amistad, apoyo moral e intelectual y por aquellos momentos compartidos.

A mis compañeros del INTECH, Argentina: Andrea, Andrés, César, Flor, Franco, María, Santiago, Rosalía, Rubén por su amistad, aquellos momentos compartidos y por su apoyo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica.

ÍNDICE

	Página.
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Índice	vii
Lista de tablas	x
Lista de figuras	xi
Resumen	xii
Abstract	xiii
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	
1. Respuesta a nivel celular y fisiológico de plantas en estrés abiótico	2
2. Respuesta a nivel molecular de las plantas bajo estrés abiótico	2
2.1 Vía I de señalización	3
2.2 Vía II de señalización	4
2.3 Vía III de señalización	4
3. Proteínas de choque térmico (HSP)	6
4. Proteínas de transferencia de lípidos (LTP)	6
5. Proteínas aquaporinas (AQP)	7
6. Proteínas (Late Embryogenesis Abundant (LEAs)	8
6.1 Clasificación de las proteínas LEAs	
6.1.1 Proteínas LEA del grupo 1	9
6.1.2 Proteínas LEA del grupo 3	10
6.1.3 Proteínas LEA del grupo 4	11
6.1.4 Proteínas LEA Atípicas del grupo 5	12
6.1.5 Proteínas LEA del grupo 6	12
6.1.6 Proteínas LEA del grupo 7	13
6.1.7 Proteínas LEA del grupo 2	14
6.1.7.1 Estructura de las dehidrinas	15
6.1.7.2 Clasificación de las dehidrinas	16
6.1.7.3 Localización de las dehidrinas	17
6.1.7.4 Posible función de las dehidrinas	17

INDICE

	Página.
7. Estrés por bajas temperaturas	18
8. Ácido abscísico (ABA)	20
9.- Modelos de estudio	
9.1 Nopal (<i>Opuntia</i> spp.)	20
9.1.1 Características morfológicas y fisiológicas del nopal	21
9.1.2 Usos y aplicaciones del nopal	22
9.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	23
OBJETIVOS	24
1. Capítulo I	24
2. Capítulo I	24
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Materiales biológico, técnicas, condiciones de crecimiento y tratamientos	
1. <i>Opuntia streptacantha</i>	26
2. <i>Arabidopsis thaliana</i>	26
3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	26
4. <i>Escherichia coli</i>	27
5. Medios de cultivos	27
6. Vectores	28
7. Técnicas de transformación	
7.1 <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y <i>Escherichia coli</i>	30
7.2 <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
8. Tratamientos de estrés	
8.1 Estrés abiótico	31
8.2 Ácido Abscísico (ABA)	32

INDICE

	Página.
9. Extracción de ácidos nucleicos	
9.1 Extracción de RNA de nopal	33
9.2 Extracción de DNA de nopal	33
10. Construcción de una biblioteca de cDNA de nopal	33
11. Análisis de expresión génica	
11.1 Ensayos de PCR en tiempo real (qRT-PCR)	35
12. Aislamiento de un fragmento de DNA genómico del gen <i>OpsDHN1</i> de nopal	36
13. Generación de plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
13.1 Amplificación del cDNA y clonación mediante el sistema GATEWAY	36
14. Transformación de <i>A. thaliana</i>	37
15. Análisis de la sobreexpresión del gen <i>OpsDHN1</i>	37
16. Tratamiento de estrés por congelamiento en <i>A. thaliana</i> que sobreexpresa el gen <i>OpsDHN1</i>	37
17. Análisis de las secuencias obtenidas de la biblioteca de cDNA	38
RESULTADOS	39
Capítulo 1 Efecto del estrés salino, prolina y poliaminas en la germinación de <i>Opuntia streptacantha</i>	39
Capítulo 2 Caracterización funcional de una dehidrina tipo SK ₃ aislada de una biblioteca de cDNA de <i>Opuntia streptacantha</i> sometida a estrés abiótico	57
DISCUSIÓN	125
REFERENCIAS	130

Lista de tablas

	Página.
Tabla 1. Composición de la solución de Hoagland 1X	27
Tabla 2. Experimentos de estrés en semihidroponia	31
Tabla 3. Experimentos de estrés en tierra	32
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del cDNA y genómico del gen <i>OpsDHN1</i>	37

Lista de figuras

Página.

Figura 1. -Esquema representativo de las diferentes vías de señalización presentes en la respuesta al estrés abiótico.....	5
---	---

Resumen

“Caracterización funcional de una dehidrina SK₃ aislada de una biblioteca de cDNA de *Opuntia streptacantha*”

En este trabajo de tesis analizamos al nopal con un enfoque fisiológico y uno molecular. La primera etapa consistió en analizar el efecto de poliaminas y prolina en la germinación de semillas de nopal (*Opuntia streptacantha*) sometidas a estrés salino. Los resultados mostraron tendencias a un porcentaje de germinación mayor en comparación al control en semillas de nopal tratadas con prolina 1 mM. En los tratamientos de poliaminas exógenas, no se observó un efecto en el rompimiento de la latencia de las semillas. Por otro lado el estrés salino afectó la germinación de las semillas de nopal, sobretodo a las concentraciones de NaCl de 50 y 75 mM. En los tratamientos donde aplicamos tanto prolina (1 y 10 mM) como poliaminas (1µM de cada una), solo el tratamiento con espermina logró obtener una recuperación en el porcentaje de germinación al someter las semillas a una concentración de NaCl de 75 mM .

En la segunda etapa se aislaron, identificaron y caracterizaron genes de nopal inducidos durante estrés abiótico. Para ello se construyó una biblioteca de cDNA de cladodios de nopal sometidos a diferentes tipos de estrés: sequía, salinidad, calor y frío. De esta biblioteca se obtuvieron 329 unigenes a partir de 442 clonas seleccionadas al azar incluyendo genes que codifican proteínas LEA (Late Embyrogenesis Abundant), ERD15 (Early Responsive to the Dehydration 15), HSP (Heat Shock Protein), AQPs (aquaporins), entre otros. Se seleccionó el EST más abundante de la biblioteca, el unigen 33 (*OpsDHN1*), que codifica una dehidrina del tipo SK₃ de 248 aminoácidos, para su caracterización molecular y funcional. Además del cDNA se obtuvo un fragmento de DNA genómico del gen *OpsDHN1*, el cual tiene un intrón de 234 pb interrumpiendo el marco de lectura abierto de este gen. La expresión del gen *OpsDHN1* se analizó mediante RT-PCR en tiempo real a partir de muestras de cladodios sometidos a estrés, mostrando que el transcrito de *OpsDHN1* se acumula en respuesta a estrés por frío y por ABA. Por otro lado, se generaron líneas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresan el gen *OpsDHN1* de nopal, las cuales tuvieron una mayor tasa de sobrevivencia en comparación al control después de la recuperación de un estrés por congelamiento, mientras que bajo estrés salino, no se observaron diferencias en la tasa de sobrevivencia entre las líneas sobreexpresantes y la parental (Col-0). Con esta evidencia se sugiere que la dehidrina de nopal (*OpsDHN1*) puede estar involucrada en los mecanismos de respuesta al estrés por congelamiento. La información obtenida en esta tesis, que incluye el aislamiento e identificación de genes de nopal en respuesta a estrés abiótico, y la caracterización de uno de ellos, constituye una plataforma inicial para el estudio de genes en *Opuntia* spp. y la generación de una base de secuencias de nopal y posibles aplicaciones para conferir tolerancia a estrés abiótico a otras especies vegetales.

Palabras Clave: dehidrina, estrés abiótico, germinación de semillas, latencia, nopal, proteína LEA.

Abstract

“Functional characterization of a SK₃ dehydrin isolated from an abiotic-treated *Opuntia streptacantha* cDNA library”

In this work we analyzed the cactus pear with a physiological and a molecular approach. The first part of this work was to analyze the effect of polyamines and proline in the germination of seeds of cactus pear (*Opuntia streptacantha*) under salt stress. The results showed trends to higher germination percentage compared to the control of cactus pear seeds treated with 1 mM proline. In the treatment of exogenous polyamines, there was no effect in breaking seed dormancy. On the other hand, salt stress affected the germination of seeds of cactus, especially at concentrations of 50 and 75 mM NaCl. In the treatments in which both proline (1 and 10 mM) and polyamines (1 μM each one) were applied, only treatment with spermine was able to recover the percentage of seeds at 75 mM NaCl. In the second part of this work, cactus pear genes expressed under abiotic stress were isolated and characterized. We constructed a cDNA library of cactus pear cladodes under different types of stress: drought, salinity, heat and cold. From this library 329 unigenes were obtained from 442 randomly selected clones including genes that encode LEA proteins (Late Embyogenesis Abundant), ERD15 (Early Responsive to the Dehydration 15), HSP (Heat Shock Protein), AQPs (aquaporins), among others. We selected the most abundant EST library, unigen 33 (*OpsDHN1*), which encodes a SK₃-type dehydrin of 248 amino acids for molecular and functional characterization. In addition to the cDNA sequences, a genomic DNA fragment of the *OpsDHN1* gene was obtained, which has an intron of 234 bp interrupting the open reading frame of this gene. qRT-PCR analysis showed that the *OpsDHN1* transcript is specifically accumulated in response to cold, and induced by ABA. On the other hand, we generated transgenic lines of *A. thaliana* overexpressing the *OpsDHN1* gene of cactus pear. These lines had a higher survival rate compared to the control after recovery from freezing stress, whereas under salt stress, there was no difference in survival rate between the transgenic lines and parental (Col-0). This evidence suggests that the dehydrin of cactus pear (*OpsDHN1*) might be involved in freezing stress responsiveness. Information obtained in this thesis, including the isolation and identification of cactus pear genes in response to abiotic stress and the characterization of one of them, constitutes an initial platform for the study of genes in *Opuntia* spp., and also for the generation of a cactus pear database and possible applications to confer abiotic stress tolerance to other plant species.

Keywords: abiotic stress, cactus pear, dehydrin, dormancy, seed germination, LEA protein

INTRODUCCIÓN

De acuerdo a su naturaleza sésil, las plantas son organismos adaptables a las condiciones ambientales existentes en su entorno. Sin embargo, factores ambientales adversos tales como la sequía, la salinidad, las temperaturas extremas, la toxicidad química, entre otros, (Wang y col., 2003; Rodríguez y col., 2005) causantes del estrés abiótico en los sistemas agrícolas, provocan una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares afectando drásticamente el crecimiento, el desarrollo y la productividad de las plantas (Close, 1996; Wang y col., 2003). El estrés abiótico causa pérdidas de cultivos a nivel mundial, reduciendo más del 50% de su producción. Se estima que para el año 2050 las tierras que son cultivables serán improductivas a consecuencia de la salinidad y la sequía (Wang y col., 2003).

Actualmente, la biología molecular de plantas ha abierto la posibilidad de manipular el genoma vegetal hacia objetivos cada vez más específicos y productivos, por ejemplo el aislamiento y caracterización de nuevos genes, el estudio de promotores tejido específico que respondan a ciertos estímulos, métodos de transformación genética de plantas más eficientes y específicos, ofreciendo un espectro de posibilidades en la resistencia a enfermedades e insectos parásitos, a la tolerancia de estrés ambientales, y en el mejoramiento del rendimiento y la calidad de los granos y frutos.

Por todo lo anterior es necesario conocer los mecanismos moleculares por los que las plantas se adaptan y toleran el estrés, mediante el uso de herramientas de biología molecular que nos permitirán identificar los genes involucrados en la tolerancia.

La secuenciación de EST's (Expressed Sequences Tag), obtenidas de condiciones de estrés en plantas ha sido usada como un método efectivo, rápido y económico para el descubrimiento de genes, para la generación de marcadores moleculares y la caracterización de patrones transcripcionales. Esta es una herramienta eficiente para identificar un gran número de genes de plantas expresados durante diferentes etapas de desarrollo y en respuesta a una variedad de condiciones ambientales.

ANTECEDENTES

1. RESPUESTA A NIVEL CELULAR Y FISIOLÓGICO DE PLANTAS EN ESTRÉS ABIÓTICO.

Las plantas al sufrir algunos tipos de estrés abiótico como la sequía, altas concentraciones de sales en el suelo y las temperaturas extremas, o por eventos programados en el desarrollo (como ocurre en la fase de la desecación de la semilla) representan un déficit hídrico. Para las plantas esto origina una serie de cambios a nivel celular como la disminución o pérdida en la turgencia, variaciones en el gradiente del potencial hídrico y en la concentración de solutos, alteraciones en la fluidez y composición de la membrana, desnaturalización de proteínas, y en las interacciones proteína-proteína, entre otros (Bray, 1997; Chaves y col., 2003). A nivel fisiológico, uno de los cambios que presenta la planta es el cierre de los estomas, lo cual origina una disminución en la tasa de transpiración (evitando la pérdida de agua) y por consiguiente una reducción en la asimilación de CO₂ (gas necesario para llevar a cabo el proceso de la fotosíntesis), lo que ocasiona una inhibición en el crecimiento de la planta (Chaves y col., 2003).

2. RESPUESTA A NIVEL MOLECULAR DE LAS PLANTAS BAJO ESTRÉS ABIÓTICO.

La señal inicial provocada por el estrés abiótico es percibida por receptores que se encuentran en la membrana celular, que con la activación inician o suprimen una cascada de transducción de señales de las células, mediante eventos de fosforilación y desfosforilación por medio de proteínas cinasas y fosfatasas. Éstas a su vez activan factores de transcripción que inducen la expresión de grupos de genes específicos que codifican proteínas que están involucradas en la respuesta al estrés en diversos procesos para ayudar a las plantas a sobrevivir bajo condiciones desfavorables (Xiong y Zhu, 2001; Xion y Yang, 2003; Bartels y Sunkar, 2005; Manajan y Tuteja, 2005). Las cascadas de transducción de señales se dividen en tres vías de señalización como se puede observar en la figura 1: la vía I está mediada por la traducción de señales a través de las MAPK cinasas e involucra la producción de

antioxidantes y osmolitos. La vía II está mediada por proteínas cinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPK) e involucra la producción de diferentes tipos de proteínas como las LEAs (Late Embryogeneis Abundant) y la vía III involucra la vía SOS (Salt Overlay Sensitive) dependiente de calcio que regula la homeostasis iónica, la cual es una vía específica para el estrés iónico (Xiong y col., 2002; Kaur y Gupta, 2005; Rodríguez y col., 2005; Singh y col., 2010).

2.1 Vía I de señalización

El estrés por salinidad, sequía, temperaturas extremas (frío y calor) causantes de la deshidratación y el estrés oxidativo son acompañados por la formación de especies reactivas de oxígeno (EROs) como los superóxidos, el peróxido de hidrógeno y los radicales hidroxilos (Apel y Hirt, 2004; Sairam y Tyagi, 2004; Rodríguez y col., 2005; Brosché y col., 2010). Una alta concentración de EROs inhibe la fotosíntesis, efecto debido principalmente al daño en el fotosistema II (Bartels y Sunkar., 2005, Rodríguez y col., 2005). Además pueden causar peroxidación en los lípidos de las membranas así como también la desnaturalización de proteínas y la mutación de los ácidos nucleicos (Mundree y col., 2002; Majan y Tuteja, 2005). Sin embargo, las plantas han desarrollado algunos mecanismos de detoxificación mediante antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutasa, peroxidasas y catalasas) o no-enzimáticos (ascorbato, glutatión, flavonoides, alcaloides y carotenoides) (Xiong y Zhu, 2002; Mittler, 2002; Sairam y Tyagi, 2004; Kaur y Gupta, 2005; Bartels y Sunkar, 2005; Suzuki y Mittler, 2006). Además otros componentes pueden funcionar como secuestradores de EROs, tales como los osmolitos compatibles: prolina, glutamato, glicina betaína, carnitina, manitol, sorbitol, fructanos, polioles, trehalosa, sacarosa, oligosacáridos, e iones inorgánicos como el K^+ . Dichas moléculas no interfieren con el metabolismo basal de las células, se acumulan en el citoplasma y en la vacuola a altas concentraciones bajo un estrés osmótico teniendo un papel en respuesta al estrés. Otra de las funciones de los osmolitos compatibles es mantener la turgencia celular, favorecer la estabilidad de las membranas y de las proteínas (Nuccio y col., 1999; Wang y col., 2003; Barteles y Sunkar, 2005). Las EROs activan la vía de las MAPKs cinasas, las cuales se encargan de realizar la transducción de

señales. La cascada de las MAPKs es activada por receptores/sensores como proteínas cinasa de tirosina, proteínas G acopladas a receptores y proteínas histidina cinasa de dos componentes. Esta señalización es activada en respuesta al estrés osmótico y es la responsable de la acumulación de osmolitos compatibles que son importantes para el ajuste osmótico (Munnik y Meijer, 2001; Zhu, 2002; Rodríguez y col., 2005). Dicha cascada la conforman tres proteínas cinasa interrelacionadas, MAPKKK, MAPKK y MAPK que son fosforiladas y activadas en los residuos de serina y treonina por una cinasa corriente arriba. La última MAPK fosforilada se encarga de fosforilar y activar compuestos específicos como lo son los factores de transcripción encargados de inducir la respuesta celular (Xiong y col., 2002; Xiong y Yang, 2003; Kaur y Gupta, 2005).

2.2 Vía II de señalización

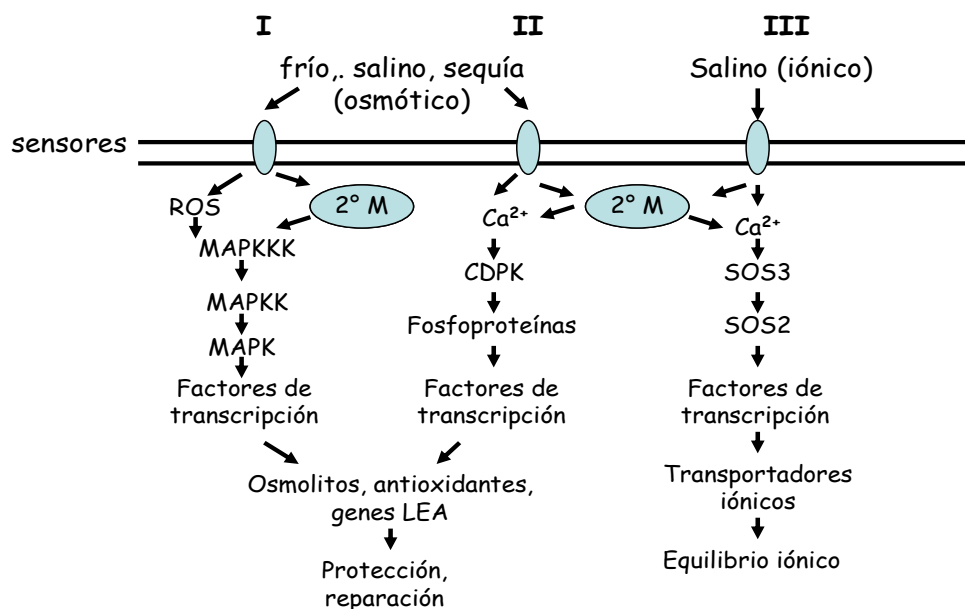
En las plantas el calcio es un nutriente esencial el cual se requiere para varias funciones estructurales de la pared y de la membrana celular, además de regular el crecimiento y desarrollo de la planta (White y Broadley 2003; Hepler, 2005). Ante un estrés iónico y osmótico se induce un incremento en la concentración de iones Ca^{2+} en el citoplasma, el cual entra a través de canales iónicos permeables de la membrana plasmática y también es liberado del retículo endoplásmico (Xiong y col., 2002; Bartels y Sunkar, 2005; Rodríguez y col., 2005). Las fluctuaciones de los niveles de calcio citosólico pueden ser detectados por proteínas cinasa dependientes de Ca^{2+} (CDPKs), calcineurinas del tipo B (CBLs) y calmodulinas (White y Broadley, 2003; Kaur y Gupta, 2005; Bartels y Sunkar, 2005; Li y col., 2008).

2.3 Vía III de señalización

Durante el estrés salino se altera la homeostasis iónica ocasionada por un aumento extra e intracelular de Na^+ , que conlleva a la activación de una señalización citoplasmática de Ca^{2+} , en la cual participa la vía SOS (Salt Overly Sensitive), en donde SOS3 (proteína que se une al calcio mediante un motivo hélice-vuelta-hélice), la cual se encarga de percibir las fluctuaciones de los niveles de Ca^{2+} citosólico provocados por el estrés. La proteína SOS3

interactúa específicamente con la proteína SOS2, que tiene actividad de serina-treonina cinasa, formando un complejo necesario para la fosforilación y activación de la proteína SOS1, el cual es un antiportador Na^+/H^+ de membrana plasmática que regula la homeostasis iónica en plantas (Sairam y Tyagi, 2004; Gong y col., 2004; Mahajan y Tuteja, 2005). De igual forma, SOS4 (cinasa dependiente de piridoxal) interviene en la regulación de la homeostasis de Na^+ y K^+ modulando las actividades de los transportadores de iones, y está implicada en la biosíntesis del piridoxal-5-fosfato, una forma activa de la vitamina B6 (Shi y col., 2002).

Vías de señalización para estrés osmótico e iónico



Xiong *et al.*, 2002

Figura 1.- Esquema representativo de las diferentes vías de señalización presentes en la respuesta al estrés abiótico. La señal de estrés es percibida a través de receptores localizados en la membrana plasmática. En la señalización vía I participa la vía de las MAPK cinasas que activa diversos factores de transcripción para inducir la respuesta celular. En la señalización de vía II participa la vía del Ca^{2+} , la cual se encarga de activar a una serie de proteínas dependientes de este catión como lo son la calmodulina, las CDPKs, entre otras. Dichas proteínas se encargan de fosforilar y activar a los factores de transcripción encargados de activar la respuesta celular. En la señalización vía III, el Ca^{2+} induce la vía de señalización SOS (Salt Overly Sensitive), la cual es específica para el estrés iónico.

Los mecanismos de tolerancia al estrés en plantas son multifactoriales, e involucran alteraciones específicas en la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas al estrés como las HSPs (proteínas de choque térmico), las LTP (proteínas transportadoras de lípidos), las AQP (aquaporinas) y las proteínas LEA (proteínas de embriogénesis tardía), entre otras. El grupo de las proteínas LEA se describirá en detalle, ya que en el presente trabajo de tesis se realizó la caracterización de una dehidrina de nopal.

3.-PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSP)

Las proteínas de choque térmico (HSP) son las responsables de llevar acabo el plegamiento, ensamble, transporte y degradación de las proteínas tanto en los procesos celulares normales como en condiciones de estrés (Feder y Hofmann, 1999; Wang y col., 2004; Swidell y col., 2007). Las HSPs o chaperonas moleculares son proteínas muy conservadas evolutivamente que se han encontrado en diversos organismos tanto procariotas como eucariotas (Hirt y Shinozaki, 2003). Estas proteínas han sido agrupadas en 5 familias en función a su peso molecular como las Hsp100 (Clp) Hsp90, la Hsp70 (DnaK), GroEL y Hsp60 (chaperoninas) y las pequeñas Hsp (sHsp) (Wang y col 2004). Las diferentes clases de proteínas HSPs en plantas se encuentran distribuidas en el citosol, cloroplastos, retículo endoplásmico y mitocondrias (Feder y Hofmann, 1999). La inducción de estas chaperonas fue descrita inicialmente en estrés por calor, sin embargo, también se han visto inducidas en respuesta a otros tipos de estrés como el osmótico, las bajas temperaturas (Sabehat, y col., 1998, Sun y col., 2001), a la exposición de metales pesados (Heckathorn y col., 2004) y a la salinidad (Liu y col., 2006).

4.- PROTEÍNAS DE TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS (LTP)

Las proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) son proteínas básicas de bajo peso molecular que han sido identificadas en una gran diversidad de plantas mono y dicotiledóneas (Kader, 1996; Arondel y col., 2000; Jang y col., 2002) incluyendo Arabidopsis (Arondel y col., 2000), maíz (Sossountzov y col., 1991), arroz (Vignols, 1997), trigo (Jang y col., 2002), entre otras. Se han caracterizado algunas de ellas por la habilidad de transferir *in vitro* fosfolípidos

entre liposomas (Kader, 1984, 1996; Jang y col., 2002). La función exacta de las LTPs aún se desconoce, sin embargo, se ha sugerido que participan en el transporte intracelular de lípidos (entre organelos). Asimismo la presencia de posibles péptidos señal en el N-terminal de estas proteínas, como la localización extracelular de algunas de ellas, ha sugerido que participan en la secreción y deposición de lípidos extracelulares que dan lugar a la formación de la cutícula (Kader, 1996; Yeats y Rose, 2008). Además, se ha visto que participan de manera directa como antimicrobianos, así como en la señalización de defensa de la planta contra el ataque de patógenos bacterianos y fúngicos, siendo clasificadas dentro del grupo de las proteínas relacionadas a patogénesis (PR-14; Yeats y Rose, 2008). Por otro lado, se ha reportado que genes que codifican para LTPs se inducen en respuesta a condiciones ambientales adversas como la salinidad, sequía, bajas temperaturas (Torres y col., 1992; Kader, 1996; Molina y García, 1993; Jung y col., 2003) y en presencia de metales pesados (Hollenbach y col., 1997). Su participación en el crecimiento y desarrollo del tejido vegetativo y reproductivo también ha sido descrita, al participar en el proceso de crecimiento de la pared celular (Yeats y Rose, 2008).

5. PROTEÍNAS AQUAPORINAS (AQP).

Las aquaporinas pertenecen al grupo de las proteínas intrínsecas de la membrana (*por sus siglas en inglés*, MIP), que son las encargadas de movilizar el agua y/o solutos pequeños de naturaleza neutra como la urea, el ácido bórico, entre otros (Chaumont y col., 2001; Javot y col., 2003; Maurel y col., 2008). En el genoma de *Arabidopsis*. se han identificado 35 genes que codifican este grupo de proteínas MIP (Johanson y col., 2001; Quigley y col., 2001). En el caso de monocotiledóneas como maíz y arroz se han identificado 31 y 33 isoformas, respectivamente (Chaumont y col., 2001; Sakuari y col., 2005). Las aquaporinas intervienen en el ajuste osmótico como mecanismo de respuesta al estrés en las plantas (Maurel y Chrispeels, 2001). En el caso de *Arabidopsis*, se reportó la acumulación de los transcritos que codifican las aquaporinas SIMIP (Salt-stress Inducible Major Intrinsic Protein) y SITIP (Salt-stress Inducible Tonoplast Intrinsic Protein) bajo condiciones de estrés salino (Pih y col., 1999). Zhang y col (2008) reportaron que en hojas de *Brassica*

juncea la expresión del gen *BjPIPI* que codifica a una aquaporina incrementó en condiciones de estrés por sequía, salinidad, frío y durante la exposición a metales pesados.

6. PROTEÍNAS LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT (LEAs).

Las proteínas LEA fueron identificadas por primera vez en semillas de algodón (*Gossypium hirsutum*) durante la etapa tardía de la embriogénesis, previo al proceso de la desecación de la semilla (Hundertmark y Hinch, 2008; Bies-Ethève y col., 2008). La presencia de estas proteínas en el tejido embrionario depende del contenido endógeno de ABA, hormona que suele aumentar en sus niveles durante la formación de las semillas sobre todo antes de su maduración (Allagulova y col., 2003). Además, se acumulan en los tejidos vegetativos cuando las plántulas son sometidas a condiciones de estrés abiótico (Hundertmark y Hinch, 2008). Dichas proteínas se han clasificado dentro del grupo de las hidrofílicas, debido a que presentan ciertas características específicas que definen a dicho grupo, tales como su alto contenido de glicinas (>6%), presentan un índice de hidrofílicidad mayor a 1 (Garay-Arroyo y col., 2000; Battaglia y col., 2008), así como la baja proporción o carencia de los aminoácidos cisteína y triptofano. Las proteínas LEA hidrofílicas presentan un alto grado de estructura desordenada en solución (Battaglia y col., 2008). El grupo de las proteínas LEA no es exclusivo del reino vegetal sino que también se ha identificado en otros organismos como en bacterias (Stacy y Aalen, 1998; Battaglia y col., 2008), levaduras (Garay-Arroyo y col., 2000; Battaglia y col., 2008), nemátodos (Browne y col., 2004, Battaglia y col., 2008), musgos (Kamisugi y col., 2005) y cianobacterias (Close y Lammers, 1993).

Las proteínas LEA se han clasificado en seis grupos basados en la homología de su secuencia, los grupos 1, 2, 3, 4, 6 y 7 pertenecen al grupo de las proteínas LEA hidrofílicas, en cambio el grupo 5 pertenece a las proteínas LEA hidrofóbicas o LEAs atípicas (Battaglia y col., 2008).

6.1 CLASIFICACIÓN DE LAS PROTEINAS LEAs

6.1.1 PROTEINAS LEA DEL GRUPO 1

Esta categoría de proteínas LEA se encuentra representada en todos los dominios taxonómicos (arqueas, bacterias y eucariontes), y se caracterizan por presentar un motivo conservado de 20 aminoácidos cuya secuencia consenso es la siguiente: TRKEQ(L/M)G(T/E)EGY(Q/K)EMGRKGG(L/E). Dicha secuencia puede estar repetida en tándem de 4 a 10 veces (Manfre y col., 2006; Battaglia y col., 2008) y se ha sugerido que dicho reacomodo de repetidos en tándem es resultado de duplicaciones génicas, seguida de eventos de recombinación o de delección (Stacy y col., 1995). En el caso de *A. thaliana* se han reportado que las proteínas ATEM1 y ATEM6 contienen cuatro copias y una copia de éste motivo conservado, respectivamente (Mafre y col., 2006). Battaglia y col.(2008) reportaron que además de la presencia del primer motivo conservado, existen otros motivos, el primero se encuentra hacia el extremo amino terminal antes del motivo de los 20 aminoácidos, la secuencia consenso es TVVPGGTGGKSLEAQE(H/N)LAE y el segundo motivo se encuentra hacia el extremo carboxilo terminal y su secuencia consenso es D(K/E)SGGERA(A/E)(E/R)EGI(E/D)IDESK(F/Y). Estas proteínas presentan un papel en la deshidratación durante la maduración de la semilla. Manfre y col. (2006) han reportado que mutantes insercionales (ATEM6) de *A. thaliana* presentan un fenotipo prematuro en la maduración de las semillas en la parte distal de las silicuas, lo que sugiere un papel importante en el desarrollo de las semillas. Estudios *in vitro* realizados en la proteína Em de trigo sugieren que esta proteína tipo LEA1 es capaz de proteger enzimas como la citrato sintetasa ó lactato deshidrogenasa (LDH) de la agregación o inactivación provocada por la desecación o por el congelamiento (Goyal y col., 2005; Gilles y col., 2007). Además se ha reportado que la sobreexpresante de esta proteína Em en *S. cerevisiae* puede atenuar la inhibición del crecimiento de la levadura en un medio de alta osmolaridad, sugiriendo que puede actuar como proteína de osmoprotección (Swire y Marcotte, 1999).

6.1.2- PROTEINAS LEA DEL GRUPO 3

Las proteínas LEA del grupo 3 se han reportado en el reino vegetal, en organismos anhidrobióticos como los rotíferos (Tunnacliffe y col., 2005), en algunos nemátodos (Solomon y col., 2000; Browne y col., 2004), en crustáceos (Hand y col., 2007; Wang y col., 2007) y en procariontes (Battista y col., 2001; Dure, 2001). Estas proteínas contienen un motivo de 11 aminoácidos que están repetidos en tándem, siendo su secuencia consenso $\Phi\Phi E/QX\Phi KE/QK\Phi XE/D/Q$, donde Φ representa residuos hidrofóbicos (Dure, 2001). De acuerdo a las predicciones *in silico* de la estructura secundaria de algunas proteínas de este grupo, se ha sugerido que este motivo de 11 aminoácidos forman alfa hélices anfipáticas, lo que permite formar dímeros por la estructura de espiral enrollada conocida como “coiled-coil” (Dure 1993, Battaglia y col., 2008). Adicionalmente se ha reportado la existencia de otros motivos conservados donde sus secuencias consenso son TAQ(A/S)AK(D/E)KT(S/Q), SYKAGETKGRKT, GGVLQQTGEQV y AADAVKHTLGM (Battaglia y col., 2008). Por otro lado, en trabajos realizados con semillas de cebada y chícharo, se ha descrito que estas proteínas se localizan en el citoplasma o en vacuolas de almacenamiento para proteínas y en la matriz mitocondrial (Marttila y col., 1996; Grelet y col., 2005). También se ha reportado su distribución en el retículo endoplásmico de células del parénquima cortical y el estroma del cloroplasto de tejidos vegetativos sometidos a bajas temperaturas (Ukaji y col., 2001; NDong y col., 2002). Con base en estudios de ganancia y pérdida de función realizados para este tipo de proteínas, se demostró que tienen un papel importante en la adaptación a condiciones de estrés. Xu y col. (1996) reportaron que las líneas transgénicas de arroz que contienen el gen *HVA1* de cebada son tolerantes a estrés salino y déficit hídrico. Asimismo, plantas transgénicas de *Arabidopsis* que contienen el gen *Wcs19* de trigo muestran un aumento en la tolerancia al estrés por congelamiento (NDong y col., 2002). Por otro lado, el silenciamiento del gen (*Ce-lea-1*) de *C. elegans* mostró una reducción significativa en la sobrevivencia del gusano durante la desecación, el estrés osmótico y altas temperaturas (Gal y col., 2004). En estudios realizados usando el sistema de expresión heteróloga de levadura (*S. cerevisiae*), se ha reportado que la expresión del gen *HVA1* de

cebada mejoró la tasa de crecimiento de las cepas transformantes de levadura bajo condiciones de estrés iónico y por congelamiento (Zhang y col., 2000). En el caso de la sobreexpresión de los genes *TaLEA2* y *TaLEA3* de trigo en levadura, las transformantes mostraron tolerancia a condiciones de estrés osmótico, salino y por frío (Yu y col., 2005).

6.1.3 PROTEÍNAS LEA DEL GRUPO 4

Inicialmente este grupo de proteínas fue localizado en embriones secos de algodón, así como en tejidos vegetativos bajo condiciones de estrés hídrico (Cohen y col., 1991; Battaglia y col., 2008; Olvera-Carrillo y col., 2010). Este grupo se ha denominado hidrofílicas, porque son proteínas altamente hidrofílicas y ricas en glicina (Garay-Arroyo y col., 2000; Reyes y col., 2005; Battaglia y col., 2008). Estas proteínas están distribuidas en el reino vegetal incluyendo plantas no vasculares (briofitas) y plantas vasculares (gimnospermas y angiospermas) (Battaglia y col., 2008). Se caracterizan por presentar en su región N-terminal un dominio conservado de 70 a 80 aminoácidos y se ha predicho que esa región forma alfa hélices anfipáticas, las cuales pueden interactuar con iones o membranas (Zhang y col., 2000), mientras que la región C-terminal es menos conservada, lo cual se predice que puede formar una conformación aleatoria (Kyte y Doolittle, 1982; Dure, 1993; Battaglia y col., 2008; Olvera-Carrillo y col., 2010). Dichas proteínas presentan 5 motivos, sin embargo, el motivo 1, localizado hacia la región N-terminal es el más caracterizado, cuya secuencia consenso es AQEKA EKMTA[R/H]DPXKEMAH ERK[E/K][A/E][K/R] (Battaglia y col., 2008). Ensayos de deshidratación *in vitro*, han demostrado que algunas hidrofílicas del grupo 2, 3 y 4 de las proteínas LEA en plantas, e hidrofílicas de *S. cerevisiae* y *E. coli* son capaces de proteger la actividad enzimática de la malato y la lactato deshidrogenasas en condiciones de baja disponibilidad de agua (Reyes y col., 2005; Olvera-Carrillo y col., 2010). En el genoma de *A. thaliana* dicho grupo de las LEA-4 está conformado por 3 miembros que son AtLEA4-1 (At1g32560), AtLEA4-2 (At2g35300) y AtLEA4-5 (At5g06760) (Olvera-Carrillo y col., 2010). En estudios realizados de ganancia o pérdida de función de estas proteínas se demostró que juegan un papel importante en la adaptación a condiciones de

estrés. Líneas mutantes de Arabidopsis en los genes *AtLEA4-5*, *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2* mostraron una reducción significativa en la tasa de germinación comparado con las semillas de la planta silvestre en condiciones de estrés osmótico, y en el caso de plantas de dichas mutantes al someterlas a condiciones de sequía, mostraron una reducción en la acumulación de biomasa y en la producción de yemas axilares y florales. Por otra parte, cuando se sobreexpresa el gen *AtLEA4-5* en Arabidopsis mostró un fenotipo de tolerancia a la sequía en comparación a las plantas silvestres, adicionalmente presentaron una mayor producción de yemas axilares y florares cuando fueron sometidas a condiciones de deshidratación-rehidratación (Olvera-Carrillo y col., 2010).

6.1.4 PROTEÍNAS LEA ATÍPICAS DEL GRUPO 5

Estas proteínas tienen un alto contenido de aminoácidos hidrofóbicos, por lo que se les ha considerado como proteínas hidrofobinas o atípicas (Battaglia y col., 2008). Este grupo de proteínas presentan un índice de hidrofiliidad menor a 1, por lo que no pueden considerarse dentro del grupo de las LEAs que son hidrofílicas. Con base en sus propiedades fisicoquímicas, éstas proteínas no son solubles después de un tratamiento de desnaturalización por calor, sugiriendo que éstas adoptan una conformación globular (Bartels y Sunkar, 2005; Battaglia y col., 2008). Por otro lado, se ha reportado que los transcritos de las proteínas del grupo 5 se acumulan en respuesta a condiciones de estrés como sequía, alta salinidad, frío, y por aplicación de ABA (Park y col., 2003; Kim y col., 2005). Estudios realizados de líneas transgénicas que sobreexpresan el gen de chile (*CaLEA6*) en plantas de tabaco y col mostraron un incremento en la tolerancia bajo condiciones sequía y salinidad (Park y col., 2003; Kim y col., 2005).

6.1.5. PROTEÍNAS LEA DEL GRUPO 6

Las proteínas del grupo 6 de las LEAs se han caracterizado por presentar un bajo peso molecular (7 a 14 kDa), contienen 4 motivos de los cuales dos son altamente conservados, presentando la secuencia consenso LEDK en el motivo 1. De acuerdo a sus características fisicoquímicas y a los análisis *in silico* se predice que dichas proteínas son intrínsecamente no estructuradas (Garay-Arroyo y col., 2000). Debido a esta característica, son proteínas que

presentan una alta flexibilidad y maleabilidad para adaptarse estructuralmente a diferentes patrones de conformación (Tompa, 2003; Dyson y Wright, 2005). La primera proteína descrita de este grupo fue la PvLEA18 de frijol y se ha reportado que los niveles de esta proteína y su transcrito se acumulan en semillas deshidratadas, en granos de polen, así como también en respuesta a un déficit hídrico y a los tratamientos con ABA (Colmenero-Flores y col., 1999; Battaglia y col., 2008). También se ha reportado que bajo condiciones normales de crecimiento, el gen *PvLea18* se expresa preferencialmente en regiones meristemáticas (Colmenero-Flores y col., 1999)

6.1.6 PROTEÍNAS LEA DEL GRUPO 7

En el grupo 7 se agrupan las proteínas ASR (Absciscic acid Stress Ripening), las cuales han sido consideradas como parte del grupo de las hidrofílicas por ser proteínas intrínsecamente no estructuradas. Además, muestran las características fisicoquímicas que definen a dicho grupo como son su alto índice de hidrofílicidad (1.7) y su alto contenido de residuos de glicina (7%) (Goldgur y col., 2007; Battaglia y col., 2008). Las proteínas del grupo 7 han sido identificadas en varias especies de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas, contienen 3 dominios altamente conservados, de los cuales el motivo 3 se encuentra localizado en la región C-terminal y contienen un probable sitio de localización nuclear (NLS) (Wang y col., 2005). Los otros dos motivos se localizan en la región N-terminal, que comprenden un segmento rico en histidinas, los cuales están involucrados con la unión de metales divalentes como el Zn^{2+} (Kalifa y col., 2004; Goldgur y col., 2007); esta unión metal-proteína induce un cambio en la conformación de la proteína pasando de un estado desordenado a uno ordenado (Goldgur y col., 2007, Battaglia y col., 2008). También se ha reportado que este tipo de proteínas se acumulan en la senescencia, maduración del fruto, semilla y polen, así como en respuesta a un déficit hídrico, salinidad, frío y durante el tratamiento con ABA (Amitai-Zeigerson y col., 1995; Silhavy y col., 1995; Padmanabhan y col., 1997; Doczi y col., 2005; Kalifa y col., 2004a; Battaglia y col., 2008). La sobreexpresión del gen *ASR1* de tomate en plantas transgénicas de tabaco confirió tolerancia a estrés salino. Los autores reportaron una menor acumulación de sodio en las

plantas transgénicas con respecto a las no transformadas, sugiriendo una reducción en la entrada de sodio o bien un incremento en su secreción (Kalifa y col., 2004b).

6.1.7.- PROTEÍNAS LEA DEL GRUPO 2

El grupo 2, lo conforman las proteínas llamadas dehidrinas (DHNs) que al igual que los anteriores grupos de proteínas LEA, también se acumulan durante la etapa tardía de la embriogénesis, además se inducen en respuesta a múltiples estreses ambientales que causan deshidratación celular tales como sequía, baja temperaturas y salinidad, así como también por ABA (Close, 1997; Chung y col., 2003; Shen y col., 2004; Lee y col., 2005). Estas proteínas presentan un amplio rango de peso molecular que va de 9 a 200 kDa, (Close, 1996; Allagulova y col., 2003), son termoestables y mantienen su integridad en soluciones acuosas por arriba de los 100 °C (Close, 1997; Allagulova y col., 2003). Se ha reportado la acumulación de transcritos que codifican dehidrinas de diferentes plantas al someterlas a condiciones de estrés abiótico, como la dehidrina CaDHN (SK₃) de chile (*Capsicum annuum*) (Chung y col., 2003), la dehidrina BcDH2 (YSK₂) de *Boea crassifolia* (hierba perene sin tallo) (Shen y col., 2004), la dehidrina OsDHN1 (SK₃) de arroz (*Oryza sativa*) (Lee y col., 2005), la dehidrina CbCOR29 (SK₃) de *Capsella bursa-pastoris* (también conocida como bolsa de pastor) (Fan y Wang 2006), la dehidrina DHN-5(SK₂) de trigo (*Triticum durum*) (Brini y col., 2007), la dehidrina WCOR410 (SK₃) de trigo (*Triticum aestivum* L.) (Shakirova y col., 2009), la dehidrina PoDHN (SK₂) de *Populus alba* x *P. temula* var. *glandulosa* (Bae y col., 2009) y las dehidrinas PpDHN1, PpDHN2 y PpDHN3 de durazno (*Prunus persica* L.) (Basset y col., 2009) durante diversos tipos de estrés.

Algunas proteínas como RAB (Responsive to Abscissic Acid) y COR (Cold-Regulated) pertenecen al grupo de las dehidrinas (Nylander y col., 2001; Lee y col., 2005), tales como la RAB21/16A (YKS₂), RAB 16B (YSK₂), RAB 16C (YSK₂), RAB 16D (YKS₂), RAB25 (Y₂SK₂) de arroz (Mundy y Chua, 1988; Kusano y col., 1992; Takahashi y col., 1994; Close, 1997; Lee y col., 2005), RAB17 (YSK₂) de maíz (Close, 1997; Godoy y col., 1994) RAB18 (Y₂SK₂) y COR47 (SK₃) de *A. thaliana* (Close, 1997; Nylander y col., 2001), CuCOR15 y

CuCOR19 de *Citrus unshiu* (Hara y col., 1999; 2001; 2003), WCOR410 (Close, 1996; 1997; Danyluk y col., 1998) y COR39 (Guo y col., 1992) de trigo (*Triticum aestivum*). Recientemente, Weiss y Egea-Cortines 2009 propusieron a las dehidrinas como marcadores transcripcionales de la respuesta a estrés por frío, por su rápida inducción bajo estas condiciones; además, se ha visto que se regulan a nivel transcripcional por los factores de transcripción CBF, los cuales participan en la respuesta a frío.

6.1.7.1 ESTRUCTURA DE LAS DEHIDRINAS

Esta familia de proteínas se caracteriza por la presencia de los siguientes motivos conservados denominados segmentos "K", "S", "Y" y "ø". La característica distintiva del grupo LEA 2 es el segmento K, el cual es rico en lisinas, consta de un motivo consenso de aproximadamente 15 aminoácidos (EKKGIMDKIKELPG), el cual forma una probable estructura α -hélice (Close 1996, 1997; Allagulova y col., 2003). Se ha sugerido que esta estructura promueve interacciones hidrofóbicas para estabilizar a macromoléculas bajo un déficit hídrico (Dure, 1993). Por otro lado, el segmento S es el segundo motivo más frecuente de este grupo de proteínas, el cual está conformado por residuos de serina (4 a 10 serinas). Ha sido demostrado que el segmento S puede ser fosforilado; esta fosforilación está relacionada con la unión de péptido señal de localización nuclear para el transporte nuclear. (Goday y col., 1994; Close 1996; 1997, Allagulova y col., 2003; Shen y col., 2004; Xu y col., 2008). El segmento Y [(V/T) DEYGNP], el cual está presente en algunas proteínas de este grupo, está localizado frecuentemente cerca del extremo amino terminal, que posee regiones de unión a nucleótidos que son parecidos a los que se encuentran en las chaperonas de plantas y bacterias (Close, 1996). El segmento ø, es el menos conservado, y también está presente en solo algunas proteínas de este grupo. Este segmento ø usualmente es rico en aminoácidos polares (especialmente treonina) y en glicinas. Dicho segmento se encuentra intercalado entre los segmentos K y puede formar puentes de hidrógeno con los grupos polares de las macromoléculas (Carpenter y Crowe, 1988; Close, 1997)

6.1.7.2 CLASIFICACIÓN DE LAS DEHIDRINAS

La clasificación de las DHNs está basada en la organización o rearreglo específico de los motivos característicos de esta familia (el segmento “K”, el segmento “S” y el segmento “Y”) y en sus propiedades bioquímicas, subdividiéndose en 5 clases, que se describen a continuación:

Dehidrinas Y_nSK₂

Estas proteínas son de naturaleza básica, contienen de 1 a 3 segmentos Y, 1 segmento S y 2 segmentos K. Se ha reportado que dichas proteínas generalmente son inducidas por ABA y bajo condiciones de estrés hídrico, pero no se ha reportado inducción a bajas temperaturas (Allagulova y col., 2003).

Dehidrinas K_n

Este subtipo de DHNs son proteínas ácidas o neutras, no contienen segmento Y o S, solo contienen de 2 a 9 segmentos K y tienden a inducirse por ABA, frío y deshidratación (Allagulova y col., 2003).

Dehidrinas SK_n

Son de naturaleza ácida y contienen un segmento S, de 2 a 3 segmentos K, y generalmente se acumulan en plantas en respuesta a bajas temperaturas (Close, 1996; Allagulova y col., 2003). En el caso de la dehidrina ERD14 de *A. thaliana*, se une a metales como Ca²⁺, evento dependiente de la fosforilación del segmento S de la proteína (Alsheikh y col., 2003).

Dehidrinas K_nS

Este subtipo de proteínas, en comparación a los subgrupos anteriores (SK_n), se caracterizan por una variación en el segmento K, el cuál comienza con el motivo (H/Q)KEG en lugar del motivo EKKG. Además, el segmento S se localiza cerca del extremo carboxilo terminal. Este tipo de dehidrinas también se ha reportado que es inducido en respuesta a frío (Close, 1996; Allagulova y col., 2003), por ejemplo la dehidrina CuCOR15 de tipo KS del *Citrus unshi* presenta alta afinidad de unión a metales como Cu²⁺ (Hara y col., 2005). Adicionalmente, la dehidrina ITP de tipo KS de *Ricinus communis*, se une a

Fe^{3+} y a su vez participa en el transporte de Hierro (Krüger y col., 2002). Dichas proteínas estas relacionadas con la reducción de la toxicidad a metales, los cuales pueden formar EROs que ocasionan desestabilización a nivel celular (Rorat, 2006).

Dehidrinas Y_2K_n

Estas proteínas ácidas generalmente contienen 2 segmentos Y, 1 o 2 segmentos K y son acumuladas en plantas en respuesta a bajas temperaturas (Close, 1996; Allagulova y col., 2003). Existen otros tipos de DHNs estructuralmente diferentes a las descritas, que no son agrupadas en la clasificación mencionada. Por ejemplo la dehidrina SK_3S de *Stellaria longipes* (GenBank Z21500) representa un híbrido entre las dehidrinas del tipo SK_n y K_nS (Zhang y col., 1993; Close, 1996; Allagulova y col., 2003). El transcrito de esta dehidrina se ha observado incrementado en condiciones de estrés ósmótico y aplicación con ABA (Zhang y col., 1993). Otro ejemplo, es la dehidrina YK_{11} de *Spinacia oleracea* (GenBank S31097) que tiene características de las de tipo K_n , Y_2K_n y K_nS que también se induce bajo condiciones de estrés por frío y sequía (Neven y col., 1993; Close, 1996; Allagulova y col., 2003).

6.1.7.3 LOCALIZACIÓN DE LAS DEHIDRINAS.

Las DHNs se han localizado en diferentes compartimientos celulares, incluyendo el citoplasma, el núcleo y la mitocondria, así como en la membrana plasmática (Close, 1996, 1997; Borovskii y col., 2002). También se ha identificado en diferentes tejidos como en puntas de las raíces, tejidos vasculares de las raíces, tallos, hojas y flores como es el caso de las dehidrinas ERD14 (SK_2) y ERD10/LT129 (SK_3) (Nylander y col., 2001).

6.1.7.4 POSIBLE FUNCIÓN DE LAS DEHIDRINAS

La función particular de cada subtipo de las DHNs aún no se conoce. Sin embargo, estudios *in vitro* revelaron que estas proteínas se unen a través de los segmentos K a vesículas de lípidos que contienen fosfolípidos ácidos y también se unen a metales pesados como el zinc, cobre y hierro a través de los

motivos ricos en histidinas (Close 1996, Hara y col., 2005; Koag y col., 2003, Kovacs y col., 2008). Además, la actividad crioprotectora de las DHNs ha sido descrita para algunas enzimas sensibles a congelamiento tales como la catalasa y la lactato deshidrogenasa (Hara y col., 2001). También se ha propuesto que actúan como chaperonas para proteger macromoléculas del citoplasma y membrana durante la deshidratación, además de mantener la estructura e integridad celular (Close 1996; 1997; Koag y col., 2003). Por otro lado, previenen la agregación o inactivación inducida por calor de varias proteínas (Kovacs y col., 2008). A su vez estas proteínas tiene actividad antioxidante, es decir intervienen en la eliminación del daño oxidativo causado por la producción excesiva de EROs (Sun y Lin, 2010). También se ha sugerido que estas proteínas previenen la peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática (Danyluk y col., 1998).

7. ESTRÉS POR BAJAS TEMPERATURAS.

La temperatura extrema es uno de los factores ambientales más importantes que afecta el crecimiento de las plantas y su desarrollo (Oullet, 2007). Cuando las plantas están sometidas a temperaturas entre 0 hasta 10 °C se considera un estrés por frío, en cambio si son temperaturas bajo 0 °C se considera un estrés por congelamiento (Solanke y Sharma, 2008). En el estrés por frío ocurre disminución en la fluidez de la membrana debido a los ácidos grasos insaturados presentes en la membrana lipídica (Wang y col., 2006; Solanke y Sharma, 2008) y una deshidratación a consecuencia de una reducción en la entrada de agua por las raíces, y al impedimento del cierre de los estomas (Solanke y Sharma, 2008). En el caso del congelamiento, las membranas presentan un daño a consecuencia de una deshidratación celular severa que está asociada con la formación de cristales de hielo. La acumulación de hielo en los espacios intracelulares causa daño físico tanto en las células como en los tejidos (Solanke y Sharma, 2008). Ambos tipos de estrés también ocasionan un estrés oxidativo debido a la generación de EROs, las cuales generan un daño en el fotosistema II y en los lípidos de las membranas, lo que conduce a la muerte de la planta (Prasad y col., 1994; Suzuki y Mittler, 2006). Sin embargo, las plantas tienen la habilidad para

sobrevivir al estrés por frío mediante el proceso de aclimatación por frío, que consiste en ajustar su metabolismo al frío e incrementar su tolerancia al congelamiento en respuesta a bajas temperaturas (Solanke y Sharma, 2008). Los efectos de las bajas temperaturas en las plantas causan una serie de cambios bioquímicos, metabólicos y fisiológicos, incluyendo la expresión de numerosos genes, acumulación de una variedad de proteínas, acumulación de osmolitos compatibles, cambio en la composición de los lípidos de las membranas, reducción en el contenido del agua, incremento de antioxidantes y la actividad de enzimas (Pearce, 1999; Thomashow, 1999; Xin y Browse, 2000; Seki y col., 2001; Minami y col., 2005; Oullet, 2007). La primera estructura dañada por el frío es la membrana plasmática por lo tanto surgen cambios en la fluidez de la misma (Oullet, 2007; Solanke y Sharma, 2008) y a su vez incrementa el contenido de ácidos grasos insaturados y fosfolípidos (Wang y col., 2006). Una vez que las plantas detectan la señal del estrés por frío a través de receptores como canales permeables a Ca^{2+} , histidina cinasas, (HK1) receptores tipo cinasas (RLKs), fosfolipasas, entre otros (Solanke y Sharma, 2008), se generan segundos mensajeros como son el inositol fosfato, las EROs, además de la calmodulina (CAM), las CBLs (Calcineurin B-Like proteins), las fosfatasas, pueden modular la concentración intracelular de Ca^{2+} , lo que conlleva a iniciar la traducción de señales en donde interviene una cascada de fosforilación de proteínas donde participan las CDPKs (CaM Domain-containing Protein Kinases) y las MAPKs (Mitogen Activated Protein Kinases). Esto a su vez conduce a la activación de factores de transcripción que son los encargados de inducir la expresión de genes en respuesta al estrés por frío (Thomashow, 1999; Solanke y Sharma, 2008). Dentro de ellos encontramos a los genes que codifican proteínas relacionadas con la síntesis de osmolitos tales como prolina, monosacáridos, oligosacáridos (sacarosa, rafinosa) poli-alcoholes (manitol, sorbitol) y compuestos de amonio cuaternario (glicinabetaína, alanina betaína). Estos compuestos disminuyen el potencial hídrico y previene la formación de cristales de hielo intracelulares (Kosová y col., 2007). Proteínas protectoras como las dehidrinas, “antifreeze proteins” (AFPs), se encargan de cubrir los cristales de hielo, para evitar el crecimiento

de los mismos y por consiguiente este mecanismo contribuye a enfrentar el estrés por congelamiento (Oulllet, 2007).

8. ÁCIDO ABSCÍSICO (ABA).

En las condiciones de estrés abiótico incluyendo el frío se presenta un aumento en el contenido de la fitohormona ABA, la cual juega un papel importante en algunos procesos celulares tales como el desarrollo de la planta, la latencia de las semillas, germinación y a la respuesta ante un estrés abiótico y biótico (Rock, 2000; Huang y Zhu, 2004). También se sabe que el ABA induce una despolarización en la membrana plasmática, lo cual ocasiona una redistribución de solutos y iones desde el tonoplasto y citoplasma hacia el apoplasto, lo cual resulta en el cierre de los estomas (Rock, 2000). El ABA participa en la inducción de genes que codifican proteínas que están relacionadas en respuesta al estrés y tal es el caso de las proteínas LEAs. Hay trabajos donde demuestran que algunos genes *LEAs* son independientes o dependientes de ABA (Shinosaki y col., 1997).

En el caso de los genes que responden ABA presentan regiones conocidas como ABRE que contiene el motivo consenso ACGTGGC que se encuentra en su región promotora (Kaplan y col., 2006)

9. MODELOS DE ESTUDIO

Hoy en día los diferentes tipos de estrés ambiental (temperaturas extremas, alta salinidad, sequía y otros) está repercutiendo en el calentamiento global, en la contaminación y en la deforestación de tierras, lo cual afecta dramáticamente al desarrollo de la planta y productividad en los cultivos. Sin embargo, existen algunas plantas que se adaptan a dichas condiciones extremas ambientales como es el caso del nopal (*Opuntia* spp.).

9.1 Nopal (*Opuntia* spp.)

El nopal es una planta xerófila que pertenece a la familia de las cactáceas y comprende 2 géneros que son *Opuntia* y *Nopalea* (Ríos y Quintana, 2004). Es un importante cultivo frutal endémico del continente americano que esta ampliamente distribuido desde Canadá hasta Argentina (Ríos y Quintana,

2004; Reyes-Agüero y col., 2006), sobre todo en regiones áridas (precipitaciones anuales de 250 mm) y semiáridas (precipitaciones anuales entre 250-450 mm) (Stintzing y Carle, 2005). En México, dicha planta se encuentra ampliamente distribuida desde el Desierto de Sonora (incluyendo regiones de Sonora, Baja California Sur, Norte de Sinaloa, Arizona y California en E.U.A) y el Desierto Chihuahuense (incluyendo regiones de Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Jalisco, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, y en E.U.A. en Nuevo México y Texas) (Flores y col., 1995). En el caso de la región del altiplano potosino-zacatecano, que se considera como zona cactológica por excelencia, destacan poblaciones silvestres de nopal de mayor tamaño y densidad, tales como: *Opuntia streptacantha* o nopal cardón, considerado el de mayor importancia económica; *Opuntia leucohicha* o nopal duraznillo; *Opuntia robusta* o nopal tapón (revisado por López y col., 1997).

9.1.1 Características morfológicas y fisiológicas del nopal

Debido a que el nopal es una planta que se desarrolla bajo condiciones extremas en las zonas áridas y semiáridas, ha desarrollado adaptaciones (anatómicas, morfológicas y fisiológicas) extraordinarias a través de su evolución que le permiten enfrentarse a este ambiente adverso (revisado por Pimienta-Barrios y col., 2003), tales como la presencia de raíces superficiales y extendidas que permiten captar el agua de las escasas lluvias que caen en dichas zonas (Nobel, 1998); tallos modificados que presentan estructuras en forma de raquetas llamados cladodios o pencas, que llevan a cabo la fotosíntesis y son suculentos porque tienen la capacidad de almacenar grandes cantidades de agua (se encuentra retenida por mucílago), para soportar largos períodos de sequía y estos a su vez se encuentran cubiertos por una cutícula gruesa de cera que impide que haya pérdida de agua (Sáenz y col., 2006) por un proceso de transpiración (salida y entrada de agua y CO₂) que es regulado por unos poros pequeños (baja densidad de estomas) hundidos. En la epidermis de dicha cutícula se encuentran unos cristales de oxalato de calcio y tricomas que se encargan de desviar los rayos solares y por consiguiente evitan la deshidratación de la planta. Los tricomas también ayudan a que la planta

transpire mejor ocasionado así una mejor circulación del aire en la epidermis y tienen espinas (hojas modificadas) que tiene diversas funciones como proteger contra los depredadores, producir sombra, reflejar la radiación solar, y condensar la humedad ambiental, todo esto ayuda a que haya una disminución en la transpiración (González y col., 2001). Otras de las adaptaciones que presenta el nopal es el tipo de fotosíntesis CAM (metabolismo de las crasuláceas) que se lleva a cabo en los tallos y que consiste en captar el agua y el CO₂ a través de los estomas durante la noche para almacenarlos y durante el día utilizar estos compuestos para la producción de nutrientes que requiere la planta para su crecimiento y desarrollo.

9.1.2 Usos y aplicaciones del nopal

El uso principal del nopal en México remota desde la época prehispánica, donde se consumía como alimento ya sea como fruta (tuna) o verdura (nopalito) formando parte de la dieta básica del humano. Se conocen cerca de 300 especies del género *Opuntia* pero solo 10 o 12 especies se aprovechan para la producción de fruta y nopalitos tales como *Opuntia ficus-indica*, *O. amyclaea*, *O. xocconostle*, *O. megacantha* y *O. streptacantha*, *Opuntia hyptiacantha*, *O. leucotricha* y *O. robusta* (Sáenz y col., 2006).

En la actualidad a nivel industrial el nopalito se usa en la producción de escabeche y en ensalmuera y la fruta para la obtención de jugos, mermeladas, colorantes, entre otros. Otro de los usos es como planta medicinal, antiguamente se utilizaban las espinas para aliviar infecciones, las pencas para disminuir el dolor y curar inflamaciones, etc. Además se utilizan para la producción de forraje (tales como *O. ficus-indica*, *O. leucotricha*, *O. streptacantha*, *O. robusta*, *O. cantabriagensis*, *O. rastrera*, *O. lindheimeiri* y *O. phaecantha*) sobre todo en épocas de escasez de agua (González y col., 2001; Sáenz y col., 2006). Otro uso es en la producción de un colorante rojo intenso obtenido de un insecto llamado cochinilla (*Dactylopius* spp.) y que se reproduce en las plantas de nopal. El colorante es usado en la industria farmacéutica, alimenticia, comestológica y textilera (Flores y col., 1995). El nopal es usado en otras aplicaciones alternativas como en la formación de cercos para limitar huertos familiares o terrenos (Flores y col., 1995). A nivel ecológico, el cultivo de nopal permite frenar la degradación ó erosión del suelo originada por las

variaciones climáticas y la actividad del hombre en zonas semiáridas y áridas, promoviendo la conversión de tierras improductivas a productivas y a su vez permite preservar la biodiversidad en dichas zonas.

9.2 *Arabidopsis thaliana*

Es una planta angiosperma dicotiledónea que pertenece a la familia de la mostaza (Cruciferae o Brassicaceae), distribuida por Europa, Asia y el Noroeste de África (Meinke y col., 1998). Se considera un excelente modelo de estudio para el área de Genética, Fisiología y Biología molecular. Esta planta tiene un ciclo de vida corto (5-6 semanas), presenta un genoma pequeño (125 Mb/ haploide), que se encuentra distribuido en los 5 cromosomas que contienen alrededor de 20,000 genes, tiene una alta fecundación porque es capaz de producir mas de 10000 semillas por planta (Meinke y col., 1998; Page y Grossniklaus, 2002). Otra de las ventajas más importantes que tiene *Arabidopsis* es la disponibilidad de la colección de mutantes insercionales de T-DNA mediante la transformación con *Agrobacterium*, lo cual constituye una herramienta importante para estudios de genómica funcional (Page y Grossniklaus, 2002; Alonso y col., 2003).

OBJETIVOS

Capítulo I

Objetivo general :

Analizar el efecto de prolina y de poliaminas en la germinación de *Opuntia streptacantha*, bajo condiciones de estrés salino.

Objetivos específicos:

1. Analizar si las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) y los tratamientos con prolina ayudan a romper la latencia de semillas de *O. streptacantha*.
2. Analizar si dichos compuestos (prolina y poliaminas) contrarrestan, en la germinación, el efecto negativo del estrés salino.

Capítulo II

Objetivo general:

Aislar y caracterizar una dehidrina de *Opuntia streptacantha* bajo condiciones de estrés abiótico.

Objetivos específicos:

1. Construir una biblioteca de cDNA de *Opuntia streptacantha* empleando RNAs aislados bajo diversas condiciones de estrés abiótico.
2. Aislar y analizar secuencias de la biblioteca de cDNA de *Opuntia streptacantha*.
3. Caracterizar molecularmente el gen *OpsDHN1* de *Opuntia streptacantha*.
 - 3.1 Analizar *in silico* el gen *OpsDHN1* que codifica una dehidrina de nopal.

- 3.2 Analizar a nivel transcripcional el gen *OpsDHN1* de *Opuntia streptacantha* bajo diversos agobios de tipo abiótico y por aplicación exógena de ácido abscísico (ABA).
4. Caracterizar funcionalmente el gen *OpsDHN1* de *Opuntia streptacantha* en *Arabidopsis thaliana*.
 - 4.1 Analizar y comparar líneas sobreexpresantes del gen *OpsDHN1* en *A. thaliana* y la parental (Col-0) bajo condiciones de estrés por congelamiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL BIOLÓGICO, TÉCNICAS, CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y TRATAMIENTOS.

1. *Opuntia streptacantha*

En 2005, se realizó una colecta de semillas de tuna Cardona (*Opuntia streptacantha* L.) en el municipio de Villa de Zaragoza, en el estado de San Luis Potosí, México. Estas semillas fueron esterilizadas con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 30% (v/v) (6% de cloro libre) por 30 min y con una solución de etanol al 70% (v/v) por 4 min. Entre cada tratamiento, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril. Las semillas desinfectadas fueron germinadas en una cámara de crecimiento a 25 °C bajo un fotoperíodo de 12 h luz/12 h oscuridad, hasta obtener la emergencia de los cotiledones y posteriormente fueron transferidas a macetas conteniendo un sustrato comercial (Cosmocel, Monterrey, México) para su posterior crecimiento. Estas plantas fueron mantenidas en una cámara de crecimiento a 25 ± 2 °C bajo un fotoperíodo de 12 h luz/12h oscuridad.

2. *Arabidopsis thaliana*

Las semillas de *A. thaliana* ecotipo Columbia-0 (Col-0) fueron desinfectadas con una solución de hipoclorito de sodio al 20 % (v/v) por 8 min, y lavadas 7 veces con agua destilada estéril. Las semillas asépticas fueron germinadas en cajas Petri con medio Murashige-Skoog (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) conteniendo 0.6% de agar y 2% de sacarosa. Las semillas fueron sincronizadas por 2 días a 4 °C y germinadas a 22 ± 2 °C durante 7 días en una cámara de crecimiento bajo un fotoperíodo de 16h luz / 8 h oscuridad.

3. *Agrobacterium tumefaciens*

La cepa de *A. tumefaciens* (GV2260) fue crecida en medio LB líquido (0.5% extracto de levadura, 1% peptona de caseína, 1% de NaCl) suplementado con 100 µg/mL de carbenicilina y rifampicina, y con 50 µg/mL de kanamicina; y se incubó a 28 °C durante 2-3 días con agitación constante. Este cultivo fue empleado como inóculo para la transformación de plantas de *A. thaliana*.

4. *Escherichia coli*

Se empleó la cepa TOP10 de *E. coli* para la transformación y clonación del DNA recombinante. Esta cepa fue conservada a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ en viales con glicerol al 50%. Cuando fue necesario, la cepa de *E. coli* fue crecida en medio LB líquido (0.5% extracto de levadura, 1% peptona de caseína, 1% de NaCl) suplementado o no con antibióticos (50 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina; 100 $\mu\text{g/mL}$ de espectinomicina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de ampicilina), e incubada a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 1 día a 200 rpm.

5. Medios de cultivos

5.1 Medio Hoagland

Para el crecimiento de plantas en condiciones semidropónicas se utilizó la solución nutritiva de Hoagland 0.5X (Hoagland y Arnon, 1950) con una modificación en la concentración de hierro. La solución stock se prepara al 1X como se menciona en la Tabla 1.

Tabla 1

Composición de la solución de Hoagland 1X

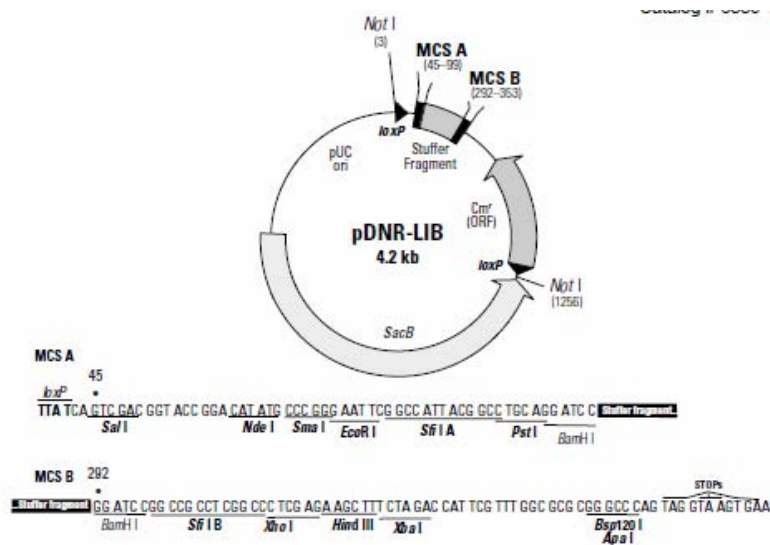
Solución	Contenido	Para 1 L de Hoagland 1X
A	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1M	1 mL
B	KNO_3 1M	6 mL
C	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 1M	4 mL
D	MgSO_4 1M	2 mL
Micronutrientes	*	1 mL
Solución de Hierro	**	0.25 mL

* Micronutrientes: 1 L de solución stock contiene: H_3BO_3 (2.86 mg), $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (1.81 mg), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.22 mg), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.08 mg), $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (0.02 mg).

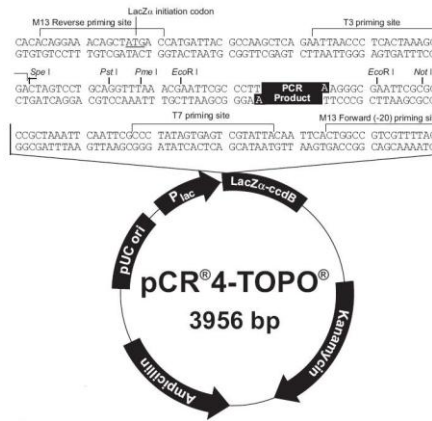
** Solución de hierro: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.089 M o bien equivalente al 2.5%), EDTA (0.07 M), pH 7.1. La preparación original de Hoagland contenía 1 mL de solución de tartrato de hierro al 5%, a diferencia de la empleada que contiene sulfato de hierro al 2.5%.

6. Vectores

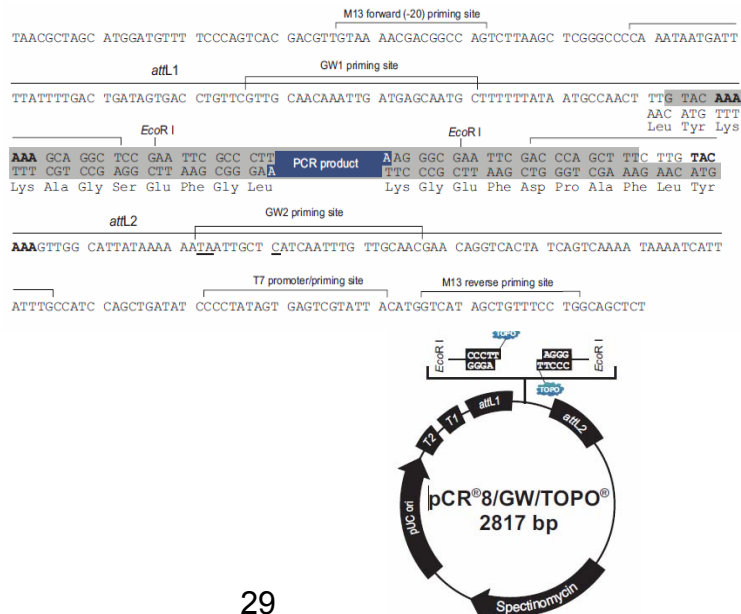
pDNR-LIB. Este plásmido es de un tamaño de 4.2 Kb, se utiliza para la construcción de bibliotecas compatibles con el Creator™ System. Contiene dos sitios LoxP que flanquean el sitio de clonación múltiple (MCS) y el gen de resistencia a cloramfenicol (Cm^r). Dicho sitio permite que el inserto pueda ser transferido mediante el uso de la Recombinasa Cre hacia un vector aceptor Creador. Además el vector contiene el gen de la sacarosa (SacB) para la selección de clonas positivas después de la recombinación realizada con la enzima Cre.



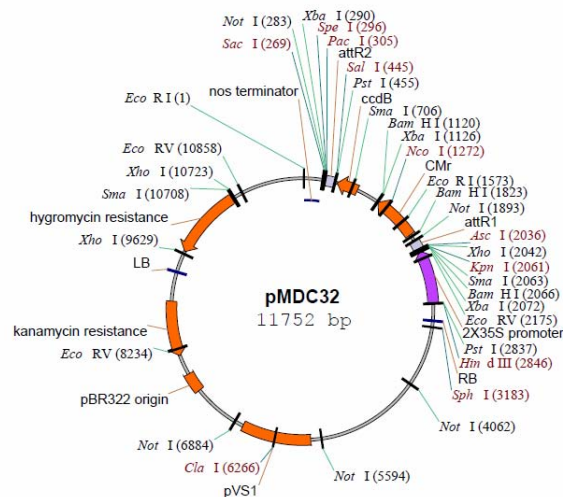
pCR4-TOPO. Es un plásmido autoreplicativo en bacteria que tiene un tamaño de 3.9 kb, posee el promotor *lac*, los genes marcadores de selección para los antibióticos kanamicina y ampicilina, un sitio de clonación múltiple (MCS), el gen letal *ccDB* que está fusionado al extremo carboxilo-terminal del gen de la β-galactosidasa (*LacZα*). Cuenta con la tecnología TOPO® Cloning TA (Invitrogen, 2006) que permite ligar de manera eficiente productos de PCR en el vector, ya que la enzima Taq polimerasa tiene una actividad transferasa terminal que agrega una desoxiadenosina (A) a los extremos del producto de PCR; estos extremos del producto de PCR con adenina se pueden unir por complementariedad a los extremos del vector linealizado que contienen timina (T) (Invitrogen, 2004). Al ligarse el producto de PCR impide la expresión de la fusión *ccDB-LacZα*, permitiendo así el crecimiento solo de las clonas recombinantes, mientras que la clonas que no contienen el inserto no pueden crecer debido a que se transcribe el gen letal (*ccDB*).



pCR8/GW/TOPO. Es un plásmido autoreplicativo en bacteria de un tamaño de 2.8 kb. El vector de entrada pCR®8/GW/TOPO® combina la tecnología TOPO® Cloning TA y la tecnología Gateway® (Invitrogen, 2004). Este vector está adaptado para permitir una fácil transferencia basada en la recombinación de productos de PCR de interés hacia los vectores destino Gateway®. La tecnología Gateway® es un método de clonación universal que se aprovecha de las propiedades específicas de la región de recombinación de bacteriófago lambda para trasladar de una manera rápida y muy eficiente un gen de interés en múltiples vectores. El gen de interés es transferido del vector de entrada hacia el vector de expresión mediante un proceso de recombinación homóloga entre sitios del vector de entrada (sitios attL1 y attL2) y sitios del vector de expresión (sitios attR1 y attR2), empleando la enzima LR clonasa (Invitrogen, 2004). Este vector también, contiene un origen de replicación pUC que permite obtener un alto número de copias en *E. coli*. Las clonas pueden ser fácilmente secuenciadas ya que contiene sitios de unión a oligonucleótidos específicos localizados en los flancos del producto de clonación. Además, contiene un gen de resistencia a espectinomicina que permite la selección de células transformadas.



pMDC32. Es un plásmido derivado del vector binario pCambia de un tamaño de 11.75 kb que se utiliza para la expresión de genes de interés en plantas. Este vector cuenta con el promotor 35S del virus del mosaico de coliflor, el cual es un promotor fuerte y constitutivo. Además, posee los bordes derecho (RB) e izquierdo (LB) de *A. tumefaciens*, por lo que un T-DNA puede ser integrado al genoma de la planta. Este vector también cuenta con la tecnología Gateway®, el cual contiene los sitios *attR1* y *attR2* que logran la recombinación homóloga de los insertos de interés clonados en los vectores de entrada (como el pCR8/GW/TOPO). Además contiene un gen de resistencia a higromicina, que permite la selección de las plantas transgénicas.



7. Técnicas de transformación

7.1. *Agrobacterium tumefaciens* y *Escherichia coli*

Se emplearon células químicamente competentes (preparadas con cloruro de calcio) de *E. coli*, o bien, electrocompetentes de *E. coli* y de *A. tumefaciens* para la transformación genética, empleando las mezclas de ligación correspondientes. Se empleó el método de transformación basado en choque térmico (Sambrook et al., 1989) y la técnica de electroporación empleando un electroporador Eppendorf 2510 de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Eppendorf North America, Inc, USA).

7.2 *Arabidopsis thaliana*

Para la transformación de plantas de *A. thaliana* se empleó el método de “floral dip” descrito por Clough (1998). Para ello, la cepa de *A. tumefaciens* GV2260 previamente transformada con el plásmido de interés fue crecida hasta una

OD₆₀₀ 0.6-07 en un medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Posteriormente, éste inóculo fue centrifugado y resuspendido en 100 mL de la solución de transformación, que contiene 0.22 g de sales MS, 5 g. de sacarosa (5%) y 50 µL de silwett L-77. Para llevar acabo la transformación en *A. thaliana*, se sumergieron las plantas en la solución de transformación por un tiempo de 15 s. Luego las plantas fueron incubadas en una cámara de crecimiento en oscuridad a una temperatura 22 ± 2 °C por un tiempo de 16-24 h y finalmente las plantas se transfirieron a una cámara de crecimiento con un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad, para posteriormente obtener semillas transgénicas.

8. Tratamientos de estrés

8.1 Estrés abiótico

Para este experimento se emplearon plantas jóvenes de *O. streptacantha* de un año de edad que fueron transferidas a macetas individuales conteniendo un sustrato comercial (Cosmocel, Monterrey, México) o bien en condiciones semihidropónicas, dependiendo del experimento a realizar. Para las condiciones semihidropónicas se usó una mezcla de arena/agrolita (relación 3:1) y regadas con la solución nutritiva de Hoagland. Los experimentos que se realizaron bajo estas condiciones se indican en la Tabla 2:

Tabla 2. Experimentos de estrés en semihidroponia

Tratamiento	Clave o abreviatura del tratamiento	Fotoperíodo	Temperatura	Duración del tratamiento
Salinidad (NaCl 250 mM)	N	12/12 h (luz/oscuridad)	25 °C	17 días
Salinidad con calor (NaCl 250 mM)	HN		40 °C	

*En este tratamiento, las macetas fueron cubiertas con papel aluminio para evitar la fotodegradación del ABA, asimismo los cladodios fueron asperjados con ABA cada 48 h.

Los experimentos de estrés realizados en macetas conteniendo el sustrato comercial se describen en la tabla 3.

Tabla 3. Experimentos de estrés en tierra

Tratamiento	Clave o abreviatura del tratamiento	Fotoperíodo	Temperatura	Duración del tratamiento
Frío	C	12/12 h (luz/obscuridad)	4 °C	17 días
Calor con Sequía	HD		40 °C	
Simulación condiciones desérticas: Calor (día), Frío (noche) con sequía	DHC		(40 / 4 °C)	
Calor (día), Frío (noche) con riego	HC		(40 / 4 °C)	

Después de cada tratamiento, los cladodios fueron transferidos a nitrógeno líquido para la posterior extracción de RNA y la construcción de una biblioteca de cDNA. Asimismo, el RNA fue empleado para análisis de expresión mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR).

8.2 Ácido Abscísico (ABA).

Para este experimento se emplearon plantas jóvenes de *O. streptacantha* de 3 meses de edad que fueron crecidas en condiciones semidropónicas, a las cuales se les aplicó solución nutritiva de Hoagland junto con la cantidad necesaria de ABA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) para obtener las siguientes concentraciones 0, 0.1 y 100 μ M durante un tiempo de 1.5, 5 y 12 h. Para evitar la fotodegradación de la hormona, el sistema semihidropónico fue cubierto con papel aluminio durante todo el experimento. Los cladodios fueron recolectados a los tiempos establecidos y congelados con nitrógeno líquido para su posteriormente realizar la extracción de RNA.

9. Extracción de ácidos nucleicos

9.1 Extracción de RNA de nopal

Se extrajo el RNA total de los cladodios de *O. streptacantha* usando el Kit RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. La integridad del RNA se visualizó en un gel desnaturalizante al 1%, y la concentración del RNA se cuantificó antes y después del tratamiento con la enzima DNasa I (Invitrogen, Carlsbad, USA), a una absorbancia de 260 nm en el espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 UV-Vis (NanoDrop Technologies) de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Dicho RNA se utilizó para generar la biblioteca de cDNA de nopal y para el análisis de PCR en tiempo real (qRT-PCR).

9.2 Extracción de DNA de nopal.

El DNA genómico fue extraído de cladodios de plántulas de *O. streptacantha* de 3 meses de edad usando el kit DNeasy Plant Mini (Qiagen, Hilden, Germany) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

10. Construcción de una biblioteca de cDNA de nopal

Se generó una biblioteca de cDNA completa usando plantas de *O. streptacantha* de un año de edad, las cuales fueron sometidas a diversos tratamientos de estrés abiótico (calor, frío y salinidad) y tratamientos con ABA como se describe en la sección 8.

10.1. Síntesis de la primera cadena de cDNA y amplificación del cDNA usando “long distance PCR (LD PCR)”.

La síntesis del cDNA se realizó a partir 1 µg de RNA total resultante de aislados de RNA obtenidos de las plantas sometidas a diferentes tratamientos de estrés, usando el CreatorTM SmartTM cDNA library Construction Kit (Clontech, Palo Alto, CA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Se empleó para la síntesis de la primer cadena de cDNA el “CDSIII/3'PCR Primer”, el cuál es un oligonucleótido d(T)₃₀ modificado que ancla sobre la cola de poliA de los mensajeros, junto con el oligonucleótido SMART IV que contiene una secuencia rica en guaninas (G) en el extremo 3'. Esta secuencia permite el alineamiento del oligonucleotido SMART IV con los nucleótidos desoxicitidina

(dC) que son adicionados por la actividad transferasa terminal de la transcriptasa reversa MMLV en el extremo 5' del RNA mensajero. Además, el oligonucleótido SMART IV crea un sitio templado para la subsecuente amplificación de la segunda cadena de cDNA empleando el oligonucleótido "5'-PCR primer" junto con la mezcla de enzimas "50X Advantage 2 Polymerase mix". Los productos de cDNA obtenidos fueron tratados con la enzima proteinasa K para inactivar la actividad de la DNA polimerasa.

10.2 Digestión con *Sfi*I

El producto de cDNA se digirió con la enzima de restricción *Sfi*I, la cual reconoce sitios específicos de corte sobre la secuencia de los oligonucleótidos empleados para la síntesis del cDNA, permitiendo la generación de sitios asimétricos *Sfi*I A y B (cohesivos) en los extremos 5' y 3' del cDNA, y así dirigir de esta manera su clonación direccional en el vector pDNR-lib. Además este sitio de restricción *Sfi*I reconoce 5 pb, y se ha reportado una baja probabilidad de corte en los cDNAs.

10.3 Purificación y fraccionamiento del cDNA digerido

El cDNA de doble cadena digerido con la enzima *Sfi*I fue fraccionado en una columna CHROMA SPIN-400 (Clontech, Palo Alto, CA), la cual permite separar las moléculas de acuerdo a peso molecular. Se colectaron 16 fracciones que fueron analizadas en un gel de agarosa al 1.1%. De estas fracciones, se seleccionaron la 8, 9, 10 y 11, conteniendo fragmentos de cDNA de 500 a 1000 pb, para su clonación en el vector pDNR-lib como se describe a continuación.

10.4 Clonación en el vector pDNR-lib y transformación en *E. coli*.

Los cDNAs fueron clonados direccionalmente en el vector pDNR-lib (Clontech) mediante una reacción de ligación empleando la enzima T4 DNA ligasa según las indicaciones del Kit CreatorTM SmartTM cDNA library Construction (Clontech, Palo Alto, CA). Posteriormente, la mezcla de ligación fue empleada para la transformación de células electrocompetentes de *E. coli* TOP 10 (Invitrogen, Carlsbad, USA), las cuales fueron seleccionadas en medio LB suplementado con 30 µg /mL de cloranfenicol.

10.5 Purificación del DNA plasmídico

Los plásmidos de las clonas individuales fueron obtenidos con el procedimiento de lisis alcalina según el protocolo descrito por Birnboim y Doly (1979). Las clonas positivas fueron identificadas mediante ensayos de PCR de colonia usando los oligonucleótidos universales M13.

10.6 Secuenciación de los plásmidos.

Los plásmidos fueron secuenciados con el equipo ABI PRISM 377 DNA automated sequencer (Perkin Elmer). Todas las secuencias de nucleótidos fueron depositadas en la base de datos del GenBank (USA) del NCBI con los siguientes números de acceso HO058618 - HO058946.

11. Análisis de expresión génica

11.1 Ensayos de PCR en tiempo real (qRT-PCR)

La síntesis de cDNA y el análisis de PCR cuantitativo fue realizado con el kit iScript™ One-Step RT-PCR junto con el fluoróforo SYBR® Green (Bio-Rad, Laboratories, Inc.). La mezcla de reacción se llevó a cabo en un volumen total de 25 μ L, en la cual se incluyó 50 ng de RNA total, 12.5 μ L del buffer de reacción 2X SYBR Green RT-PCR, 200 nM de cada oligonucleótido (ver Tabla 4) y 1 μ L de la enzima transcriptasa reversa iScript MMLV (Bio-Rad, Laboratories, Inc.). Las condiciones para el PCR tiempo real fueron las siguientes: 10 min a 50 °C y 5 min a 95 °C para la síntesis de cDNA y la inactivación de la enzima transcriptasa reversa iScript MMLV; seguido de 40 ciclos de 10 s a 95 °C y 30 s a 60 °C. Las curvas “melt” fueron obtenidas mediante 80 ciclos de 1 min a 95 °C, 1 min a 55 °C y 10 s a 55 °C, incrementando la temperatura 0.5 °C por cada ciclo. Dicho procedimiento se realizó con el termociclador iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Laboratories, Inc). Los análisis fueron realizados por triplicado. La cuantificación relativa del gen *OpsDHN1* fue expresada como niveles de abundancia relativa del RNA mensajero en la condición de interés con respecto a la condición control (sin tratamiento), posterior a la normalización con el gen que codifica al factor de elongación EF1 $^{\alpha}$ de *O. streptacantha* (*OpsEF1 $^{\alpha}$* ; No. de acceso HM581972) mediante el método comparativo ciclo umbral (CT; threshold cycle) ó $\Delta\Delta$ CT (Livak y Schmittgen 2001).

12. Aislamiento de un fragmento de DNA genómico del gen *OpsDHN1* de nopal

El DNA genómico fue amplificado empleando un par de oligonucleótidos (ver tabla 4.) diseñados en base a la secuencia completa de cDNA del gen *OpsDhN1*, el cual se aisló e identificó en la biblioteca construida en esta tesis. Las condiciones del PCR fueron las siguientes: 5 min a 94 °C, junto con 35 ciclos de 60 s a 94 °C, 60 s a 59 °C y 2 min a 72 °C y una extensión final de 7 min a 72 °C. El producto de PCR obtenido fue de 1139 pb, el cual fue clonado en el vector pCR4-TOPO (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Carlsbad, USA) para su posterior secuenciación. Esta secuencia fue depositada en la base de datos del GenBank con número de acceso HM581971.

13. Generación de plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*

13.1 Amplificación del cDNA y clonación mediante el sistema GATEWAY

Se amplificó el marco de lectura abierto (ORF) y 76 pb del extremo 3'-UTR del cDNA de la dehidrina de nopal (*OpsDHN1*) con los oligonucleótidos 5OpsDHNORF y 3OpsDHNUTR (Tabla 4.). El producto de PCR fue clonado en el vector de entrada pCR®8/GW/TOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA) y posteriormente fue subclonado en el vector de expresión pMDC32 mediante recombinación específica la enzima LR clonasa (Gateway LR Clonase II mix; Invitrogen, Carlsbad, CA).

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación del cDNA y genómico del gen *OpsDHN1* .

Aplicación	Gen	secuencia de los oligonucleótidos	Tamaño del amplicon
qRT-PCR	<i>OpsDHN1</i>	5OpsDHN1 5'-GATCGCGGACTGTTCTGACTT-3' 3OpsDHN1 5'-GTCGGAACGATGGAGCTTGT-3'	171 pb
	<i>OpsEF1</i>	5PvEF1 5'-GGTCATTGGTCATGTCTGACTCTGG-3' 3PvEF1 5'-GCACCCAGGCATACTTGAATGACC-3'	150 pb
Amplificación de un fragmento del DNA	<i>OpsDHN1</i>	5gOpsDHN1 5'-GGGACAGCAAAGCAAAGCA-3' 3gOpsDHN1 5'-TCGAAAAGCATAAATCATCAAAGTTCC-3'	1139 pb
Amplificación del cDNA (ORF y 3'-UTR)		5OpsDHNORF 5'- CCAATTTCTGAAATGGCGGAAG-3' 3OpsDHNUTR 5'-GCATAAATCATCAAAGTTCCTGAC-3'	835 pb

14. Transformación de *A. thaliana*.

La transformación de *A. thaliana* mediante *Agrobacterium tumefaciens* se llevó a cabo con el método de inmersión floral. La selección de las plantas transgénicas se realizó en agar nutritivo MS 0.5X suplementado con 50 µg/mL de higromicina. La generación T2 de las plantas transgénicas (35S::*OpsODHN1*) fueron transferidas a tierra. Las líneas homocigotas fueron analizadas por la segregación de la resistencia en higromicina en la progenie T3.

15. Análisis de la sobreexpresión del gen *OpsDHN1*.

La expresión del gen *OpsDHN1* en *A. thaliana* fue evaluado mediante RT-PCR punto final. Se empleó usó 1 µg de RNA total para la síntesis de la primera cadena de cDNA usando el sistema SuperScript™ First-Strand Synthesis System (Invitrogen, Carlsbad, USA) siguiendo el protocolo descrito por Rodríguez-Kessler *et al.* 2008. El gen *OpsEF1* fué usado como control de carga.

16. Tratamiento de estrés por congelamiento en *A. thaliana* que sobreexpresa el gen *OpsDHN1*.

Se crecieron plantas silvestres (Col-0) y plantas transgénicas de tres líneas homocigotas de la progenie T3 (35S::*OpsDHN1*) de un mes de edad en una

cámara de crecimiento (22 ± 2 °C), bajo un fotoperíodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Posteriormente, fueron aclimatadas a frío a una temperatura de 4 °C por 12 h, después de este paso las plantas fueron sometidas por 2 h a -15 °C y fueron asperjadas con agua fría para inducir la formación de hielo. Posteriormente, dichas plantas fueron descongeladas a 4 °C por 12 h y por último se transfirieron a una cámara de crecimiento para su recuperación bajo condiciones óptimas de crecimiento. La tasa de sobrevivencia de las plantas fue calculada después de un período de 21 días, la cual fue expresada en porcentaje de plantas que se recuperaron después del tratamiento de estrés por frío.

17. Análisis de las secuencias obtenidas de la biblioteca de cDNA

Todas las secuencias fueron analizadas con el programa Vector Screen para eliminar la contaminación de vector (www.ncbi.nlm.nih.gov/Vescreen). Posteriormente, con el programa Seqman (DNASTAR, Madison, WI) fueron agrupadas en “contigs” (grupos de secuencias de DNA que sobrelapan). La búsqueda de homología en las secuencias se realizó mediante los programas BLASTN y BLASTX (GenBank non-redundant (nr) y EST) de la base de datos del Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov). El análisis de la clasificación funcional fue realizado de acuerdo a las bases de datos Gene Ontology (www.geneontology.org/) y TIGR de *A. thaliana* (www.tigr.org/). Los posibles dominios de cada proteína fueron identificados con el ProtParam del servidor ExPASy proteomics del Instituto de Bioinformática de Suiza (SIB; www.isbsib.ch) y el InterProScan del Instituto de Bioinformática Europeo (EBI; www.ebi.ac.uk). La señal de localización nuclear (NLS) fue predicha con el servidor PredictNLS server del CUBIC (del centro de Bioinformática de la Universidad de Columbia). El alineamiento de las secuencias de las proteínas se realizó con los programas CLUSTAL W y T-Coffee de la base de datos EBI. Los alineamientos “pairwise” globales y locales fueron realizados para establecer los porcentajes de identidad entre dos proteínas usando los programas de alineamiento Needleman-Wunsch y Smith-Waterman de la base de datos EBI, respectivamente. La construcción de árboles filogenéticos se realizó con las aplicaciones del paquete 3.67 PHYLIP (Phylogeny Inference Package; Felsenstein, 1989).

RESULTADOS

Capítulo 1

Efecto del estrés salino, prolina y poliaminas en la germinación de *Opuntia streptacantha*.

Este trabajo fue realizado para determinar si las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) y los tratamientos con prolina ayudan a romper la latencia de las semillas de *O. streptacantha*, además de conocer si estos compuestos favorecen a la germinación de las semillas cuando están bajo un estrés salino. Para ello las semillas se sometieron a los siguientes tratamientos: a) aplicación de poliaminas (Put, Spd ó Spm a 1 μ M), (b) aplicación de prolina (1 ó 10 mM), (c) y tratamiento con NaCl a 25, 50 ó 75 mM. Posteriormente, se llevaron a cabo mezclas de los tratamientos anteriores, los cuales fueron: (d) mezcla de poliaminas PAs (Put, Spd y Spm) con cada una de las concentraciones de prolina, (e) cada poliamina (Put, Spd, y Spm) junto con cada una de las soluciones de sal y (f) cada concentración de prolina con cada solución de sal. Todos los resultados de los experimentos fueron analizados estadísticamente. En el caso del experimento que fueron tratados solamente con prolina a 1mM la tendencia es a presentar un porcentaje más alto en la germinación en comparación al control (no tratadas), sin embargo las diferencias no fueron estadísticamente significativas ($F = 1.500$, $P > 0.5$). En cambio el tratamiento con poliaminas no indujo rompimiento de la latencia de las semillas ya que no hubo diferencias estadísticamente significativas en el porcentaje de germinación. Para el caso del tratamiento con estrés salino a la concentración de NaCl a 25 mM no hubo variaciones en la germinación con respecto a las semillas control, sin embargo, en las concentración de NaCl a 50 mM, el porcentaje de germinación fue más bajo en comparación al control, y en NaCl a 75 mM hubo una completa inhibición en la germinación. En el caso del tratamiento con prolina a la concentración de 1 y 10 mM junto con estrés salino se observó una disminución en la germinación conforme incrementó la concentración de sal (NaCl a 50 mM), hasta obtener una inhibición en la germinación en la concentración más alta de sal (NaCl a 75 mM).

Para el caso del tratamiento de poliaminas junto con sal, se observó que el porcentaje de germinación disminuyó al incrementar la concentración de sal, a excepción del tratamiento con Spm donde se observó una mejoría en la germinación al someter las semillas a una concentración de NaCl a 75 mM. Dichos resultados han demostrado primeramente que los tratamientos con poliaminas no ayudan a romper la latencia de las semillas, sin embargo con prolina 1mM sin estrés salino se estimuló la latencia en cambio los tratamientos aplicados ya sea prolina o poliaminas junto con estrés salino no ayudaron al mejoramiento de la germinación.

Manuscrito publicado en la revista “Journal of the Professional Association for Cactus Development” año 2008.

Effect of Salt Stress, Proline, and Polyamines on Seed Germination of *Opuntia streptacantha*

Ana E. Ochoa-Alfaro¹, Claudia O. Silva-Ortega¹, Alicia Becerra-Flora¹,
Joel Flores-Rivas² and Juan F. Jiménez-Bremont^{1*}

¹ División de Biología Molecular,
Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica,
Camino a la Presa de San José 2055,
Apartado Postal 3-74 Tangamanga, 78210,
San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.

² División de Ciencias Ambientales,
Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica,
Camino a la Presa de San José 2055,
Apartado Postal 3-74 Tangamanga, 78210,
San Luis Potosí, San Luis Potosí, México

* Author for correspondence; phone: (+52) 444-8-342000; fax: (+52) 444-8-342010,
email: jbremont@ipicyt.edu.mx

ABSTRACT

In this study we conducted experiments in order to determine whether polyamines (putrescine, spermidine, and spermine) and proline treatments help to break seed dormancy of *Opuntia streptacantha* and also if they facilitate seed germination under salt stress. The results showed that 1mM proline stimulated a better germination percentage as compared to untreated seeds, although the difference was not statistically significant. With respect to polyamines, they did not break seed dormancy. On the other hand, salinity affected seed germination at the higher concentrations (50 and 75 mM NaCl) used, whereas, at 25 mM NaCl, results were similar to the control. The germination percentage in the treatments with proline (1 and 10 mM) and with polyamines (1μM each) diminished significantly when increasing the concentration of NaCl. The exception was spermine treatment, which alleviates seed germination at the higher concentration of NaCl used (75 mM).

Keywords: *Opuntia streptacantha*, Polyamines, Proline, Salt stress, Seed germination.

Abbreviations: Spd–Spermidine; Spm–Spermine ; PAs–Polyamines; Pro–Proline; Put–Putrescine.

1. INTRODUCTION

Seed germination is a process that begins with the uptake of water by the dry seed and it finishes with elongation of the embryo axis (Bewley and Black 1994). This process is affected by adverse factors such as salinity, which is one of the major abiotic stresses that affect plant growth and

development, especially in arid and semiarid regions (Neumann 1997, Chinnusamy et al. 2005, Cony et al. 2006). This stress condition could affect the germination of seeds when high osmotic potential is created, which prevents water uptake (osmotic effect) or causes toxic effects of Na^+ and Cl^- ions (Okçu et al. 2005 and references therein). Plants respond and adapt to stress to survive by complex molecular responses, including the accumulation of compatible solutes, the production of protective proteins, and the expression of different sets of genes, which are part of the plant signaling and defense system against high salt stress (Zhu 2001, Sairam and Tyagi 2004). Proline (Pro) is one of the most widely distributed osmolytes in stress conditions not only in plants but also in other organisms (Delauney and Verma 1993; Bartels and Sunkar 2005). Pro has diverse functions, such as stabilization of subcellular structures (proteins and membranes), it functions as a hydroxyl radical scavenger and serves as a source of carbon and nitrogen (Kavi-Kishor et al. 2005). In addition, Pro could act as a component of signal transduction pathways that regulate stress responsive genes (Khedr et al. 2003). Poljakoff-Mayber et al. (1994), suggested a possible role of Pro during seed germination, since they found that dry seeds of *Kosteletzkya virginica* contain a significant amount of betaine but low Pro, but during germination and in the presence of NaCl the betaine content decreased, while the Pro content increased. Furthermore, Pro application in *Zygophyllum simplex* seeds alleviates either the breaking innate seed dormancy or the effect of low salinity on seed germination (Khan and Ungar 1997).

On the other hand, polyamines (PAs) are polycationic compounds of low molecular weight that have been implicated in various physiological processes, such as rhizogenesis, somatic embryogenesis, pollen formation, flowering and initial fruitlet abscission, dormancy, senescence and the response to abiotic and biotic stresses (Bouchereau et al. 1999, Jiménez-Bremont et al. 2006, 2007, Rodríguez-Kessler et al. 2006, 2008). In addition, it has been suggested that PAs may play a role in the accumulation of seed storage proteins and in the seed maturation (Santanen and Simola 1999) and that they help to promote seed germination (Prakash and Prathapasenan 1988, Sińska and Lewandoska 1991, Zeid and Shedeed 2006). PAs biosynthesis increases greatly in response to stresses and its function is presumed to be protective with a role in scavenging free radicals (Ha et al. 1998, Mansour 2000). NaCl salinity causes both ionic imbalance and water stress, creating membrane damage (Tiburcio et al. 1994). PAs prevent uptake of Na^+ , loss of K^+ , and leakage of amino acids and electrolytes from plant tissues (Chattopadhyay et al. 2002). It was suggested that PAs contribute to maintaining cellular cation-anion balance and help in the stabilization of the membrane integrity through their low molecular mass and polycationic nature (Smith 1985).

Several reports in Cactaceae have shown that an increase of the salt concentration diminishes the germination percentage (Romero-Schmidt et al. 1992, Nolasco et al. 1996, Vega-Villasante et al. 1996). In the case of *Opuntia* species, there are studies about chemical and mechanical pretreatments used to stimulate seed germination and thus break seed dormancy (Olvera-Carrillo et al. 2003, Mandujano et al. 2005, 2007, Altare et al. 2006). However, it is not known if PAs and Pro exogenous application breaks seed dormancy or if they protect seed germination under salt stress conditions. For this reason, in this present study we examined the effect of PAs such as putrescine (Put), spermidine (Spd) and spermine (Spm), and Pro in breaking seed dormancy and also if they facilitate seed germination of *Opuntia streptacantha* under salt stress.

♦ Received 18 October 2007, Accepted 10 July 2008.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Material of seeds and germination conditions

Opuntia streptacantha seeds were collected of “Cardona” variety cactus pears, of the region of Villa de Zaragoza of the state of San Luis Potosí, México (Silva-Ortega et al. 2008). Seeds collection was January 2005, and they were stored at room temperature during twenty-four months. Seeds were sterilized with 30% (v/V) commercial sodium hypochloride solution for 30 min and with 70% (v/V) ethanol for 4 min, and rinsed three times in sterile distilled water between each treatment.

2.2 Treatments of seeds

Seeds were subjected to the following treatments: (a) PAs (1 μ M Put, Spd or Spm), (b) Pro (1 or 10 mM), (c) and for salt treatment (25, 50, or 75 mM NaCl). We also used mixtures of the previous treatments: (d) Mix of PAs (Put, Spd, and Spm) with each Pro concentration, (e) PAs (Put, Spd, and Spm) with each salt solutions and (f) each Pro concentration with each salt solutions.

For each treatment five replicates, with twenty seeds per replicate, were used. The seeds were placed in Petri dishes containing a perlite support. For the control we added 20 ml of sterile distilled water and for the treatments we added 20 ml of each of the solutions previously described. These experiments were carried out in a growth chamber at 25°C with a photoperiod of 12 h light/12 h dark cycle. The number of seeds germinated was recorded every two days during 2 months, considering that a seed was germinated when it showed the radicle emerged.

2.3 Statistical analysis

To explore potential differences in seed germination percentage, a one-way ANOVA was used, with treatment as the main factor. Before analysis, the data were transformed using square-root arcsine, as it is recommended for the percentage data (Sokal and Rohlf 1995). Differences among treatments were explored through orthogonal contrasts.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Breaking seed dormancy

It has been found that many Cactaceae have prolonged seed dormancy, with low or null germination (Rojas-Aréchiga and Vázquez-Yanes 2000, Flores et al. 2005, 2006, 2008). Specifically, one genus of this family considered as having seed dormancy is *Opuntia*. The first species found to have dormant seeds was *Opuntia aurantiaca* (Archibald 1939) and, up to the present, seed dormancy has been found in 28 *Opuntia* species (see Table 1).

Here we show that in the untreated seeds of *O. streptacantha* the germination percentage was low (14%), meaning that this cactus species presents seed dormancy (Figure 1A). This result is similar to that reported for seeds of other species of the *Opuntia* genus (Table 1). Several dormancy-breaking treatments, including scarification with sulfuric acid, mechanical scarification, after-ripening, cold stratification, leaching, passage through the digestive tract of animals, soaking in hot water, and some combinations of these treatments have been suggested to enhance germination of

Opuntia seeds. However, these treatments do not always promote germination and, in some cases, treated seeds have germinated to lower percentages than those in the control (Orozco-Segovia et al. 2007). Gibberellic acid (GA_3) alone seems to be only moderately effective in promoting seed germination of *Opuntia* spp. (Wang et al. 1996). However, it induces a high percentage of germination in combination with other treatments such as rinsing/washing, chemical or mechanical scarification (Orozco-Segovia et al. 2007).

3.2 Effect of the application of proline and of polyamines on the germination.

Due to the low germination percentage obtained for *O. streptacantha*, in the present study we evaluated the effect of exogenous application of Pro and PAs on breaking seed dormancy. Our results showed that at 1 mM Pro treatment the germination percentage was higher than the control; however, this difference was not significant ($F = 1.500$, $P > 0.5$). Also, at 10 mM Pro, we observed that there was not a significant difference in the germination percentage with respect to the control ($F = 0.001$, $P > 0.5$; Figure 1A). It has been reported that Pro treatments (1 and 0.1 mM) alleviated the innate dormancy of *Zygophyllum simplex* seeds and germination reached 40-60% compared to 12% in the control (Khan and Ungar 1997).

The PA treatments used in this experiment did not stimulate the breaking seed dormancy, because there were not significant differences in germination percentages among PAs and the control (Figure 1B). It was observed that with Put treatment the germination percentage was slightly higher than the control, but this difference was not significant ($F = 0.004$, $P > 0.5$). It has been reported that Put promotes the germination of various species, for example *Oryza sativa* (Prakash and Pratapasenan 1988), *Hordeum vulgare* (Locke et al. 2000), *Citrullus lanatus* (Korkmaz et al. 2004), *Cucumis melo* (Korkmaz et al. 2005) and *Medicago sativa* (Zeid and Shedeed 2006). However, other authors have found that Put inhibits germination. Amoroso-Botelho and Juliano-Gualtieri (2001), reported that the treatment with 0.5 mM Put did not affect the seed germination of *Peltophorum dubium*, while a negative effect was observed at 1.0 mM Put. Moreover, at 0.1 μ M and 0.1 mM Put, the germination of the cacti *Turbinicarpus lophophoroides* and *Turbinicarpus pseudopectinatus* was inhibited (Flores et al. 2008). In other plant species, an effect of PAs in the germination has been reported, for example in apple (*Malus domestica*) the exogenous application of Put and Spd (0.1 and 1 mM) stimulated the germination, whereas Spm inhibited it (Sińska and Lewandowska 1991). In *Peltophorum dubium* Spd treatments (0.5 mM and 1.0 mM) did not affect seed germination (Amoroso-Botelho and Juliano-Gualtieri 2001). Thus, we suggest that the effect of PAs in the seed germination depends on the plant species.

We carried out an experiment with the mixture of Pas (1 μ M Put, Spd, and Spm) with Pro concentrations (1 and 10 mM). Using the higher concentration of Pro (10 mM) with a mix of PAs (1 μ M of each one) a negative effect on seed germination was observed, although it was not statistically significant ($F = 3.025$, $P > 0.05$). The lower concentration of Pro (1 mM) and a mix of PAs (1 μ M of each one) showed a similar behavior than the control ($F = 0.446$, $P > 0.05$; Figure 1A).

3.3 Effect of salt stress on the germination.

In a general way, we found that the germination of seeds of *O. streptacantha* was significantly affected by salt stress. The percentage of germination of *O. streptacantha* seeds treated with 25 mM NaCl was similar to the control ($F = 0.045$, $P > 0.05$), while at 50 mM NaCl the germination percentage was lower than the control ($F = 17.633$, $P < 0.0001$) and at 75 mM there was a complete inhibition (Figure 2). The results of this study showed that *O. streptacantha* seed germination is affected by salt stress like in other cacti species. For example, in the “cactus barril” (*Ferocactus*

peninsulae), the “cardón gigante” (*Pachycereus pringlei*) and the “cardón barbón” (*Pachycereus pecten-aboriginum*) the seeds were able to germinate at 25 and 50 mM NaCl, while at 100 mM the percentage of germination diminished and at 200 and 300 mM there was a complete inhibition (Romero-Schmidt et al. 1992, Nolasco et al. 1996, Vega-Villasante et al. 1996).

3.4 Effect of the application of proline during the germination of seeds under salt stress.

In general, the germination percentage in the treatments with Pro (1 and 10 mM) significantly diminished when increasing the NaCl concentration, leading to an inhibition of germination at the higher concentration (75 mM) (Figure 3). Our results are similar to those reported by Poljakoff-Mayber et al. (1994) in *Kosteletzkya virginica*, in which the exogenous application of Pro (10 mM) did not improve germination under salt stress conditions (100 mM NaCl). Khan and Ungar (1997) reported that Pro application in *Zygophyllum simplex* seeds alleviates the effect of low salinity (25 mM NaCl), and induced seed germination, being more effective at the lower Pro concentration (0.1mM) than at the higher concentration (1mM). However, at higher salinity treatments (75 and 125 mM NaCl) Pro was ineffective in alleviating the dormancy of seeds. On the other hand, although in our study the exogenous application of Pro did not improve seed germination under stress, it is important to mention that we have shown a significant Pro accumulation in cladodes of the same species (*O. streptacantha*) under salt stress (Silva-Ortega et al. 2008), suggesting that the effect of Pro depends on the developmental stage of the plant.

3.5 Effect of the application of polyamines during the germination of seeds under salt stress.

The application of exogenous PAs (Put, Spd, or Spm) did not produce a significant difference in the percentage of germination respecting control seeds as described above (Figure 4). In the case of simultaneous application of each PAs and salt stress treatments, we observed that the germination percentage significantly diminished as the salt concentration increased together with the addition of Put and Spd. However, Spm treatment alleviated seed germination (4%) at the higher concentration of NaCl used (75mM); it showed a recovery of 28.57%, as compared to the percentage of germination of control plants (14%). At this concentration of NaCl, seed germination was completely inhibited by salt stress, whereas at these same conditions the application of Put and Spd, or Pro did not stimulate germination.

Our results are in agreement, specifically Spm, with the idea that polyamines may be involved in salt stress protection. In a previous study, we have observed an accumulation of Spm in a bean tolerant cultivar at higher concentrations of NaCl used (150 and 400 mM), suggesting that Spm might be part of the mechanism conferring salt tolerance (unpublished data). Zapata et al. (2004) reported a significant increase in Spm and Spd levels during germination of different plant species such as lettuce (*Lactuca sativa* L.), pepper (*Capsicum annuum*) and broccoli (*Brassica oleraceae* L. var. *Italica* Plenk.) under conditions of salt stress (150 mM NaCl). A protective role for Spm in abiotic stress such as high salt or drought stress has been shown in the Arabidopsis spermidine synthase (*acl5/spms*) double mutant that does not produce Spm. This Arabidopsis Spm-deficient mutant is hypersensitive to high concentrations of NaCl and also to drought stress; and this phenotype was rescued by exogenously applied Spm (Yamaguchi et al. 2006, 2007). This mutant caused a defect of Ca⁺ homeostasis, evidencing a protective role for Spm in the context of responses to ionic stress (Yamaguchi et al. 2006). On the other hand, Zhu et al. (2006) reported that the exogenous application of PAs, specifically Spd inhibits Na⁺ transport from roots to shoots in barley seedlings under conditions of high salinity, suggesting that PAs could be a mechanism for alleviating salt stress. In a recent report, Zhao et al. (2008) showed that exogenous application of PAs, specifically Spd blocked the inward Na⁺ and K⁺ currents (especially Na⁺ currents) in barley

root epidermal and cortical cells. In root xylem parenchyma, the inward K^+ current was also blocked by extracellular Spd, while the outward K^+ current was enhanced. Thus, by repressing Na^+ influx into roots and by preventing K^+ loss from shoots, PAs improved K^+/Na^+ homeostasis in barley seedlings to cope with high saline conditions.

4. CONCLUSIONS

1. *Opuntia streptacantha* presents seed dormancy, which could not be broken down by the different treatments used (Pro, Pas, and Pro plus PAs).
2. The treatments with higher salinity (50 and 75 mM NaCl) affected dramatically the seed germination, whereas the treatment of 25 mM NaCl allowed a similar germination percentage as the control.
3. Germination under salt stress conditions could not be alleviated by the application of different treatments (Pro and PAs), excepting by Spm which promoted 4% of seed germination at 75 mM NaCl.

5. REFERENCES

- Altare, M., S.Trione, J.C. Guevara, and M. Cony. 2006. Stimulation and promotion of germination in *Opuntia ficus-indica* seeds. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 8:91-100.
- Amoroso-Botelho, B., and S.C. Juliano-Gualtieri. 2001. Growth regulators and water stress in canafistula seed germination. *Scientia Agricola* 58:43-49.
- Archibald, E.E.A. 1939. The development of the ovule and seeds of jointed cactus (*Opuntia aurantiaca*). *South African Journal of Science* 36:195-211.
- Bartels, D., and R. Sunkar. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24:23-58.
- Baskin, J.M., and C.C. Baskin. 1977. Seed and seedling ecology of *Opuntia compressa* in Tennessee cedar glades. *Journal of the Tennessee Academy of Science* 52:118-122.
- Bewley, J.D., and M. Black. 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. 2nd edition. Springer, 460 pp.
- Bouchereau, A., A. Aziz, F. Larher, and J. Martin-Tanguy. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* 140:103-125.
- Chattopadhyay, M.K., B.S Tiwari, G. Chattopadhyay, A. Bose, D.N. Sengupta, and B. Ghosh. 2002. Protective role of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Physiologia Plantarum*. 116:192-199.
- Chinnusamy, V., A. Jagendorf, and J.K. Zhu. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science Society of America* 45:437-448.

- Cony, M.A., S.O. Trione, and J.C. Guevara. 2006. Macrophysiological responses of two forage *Opuntia* species to salt stress. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 8:52-62.
- Cook, C.W. 1942. Insects and weather as they influence growth of cactus on the Central Great Plains. *Ecology* 23:209-214.
- D'Aubeterre, R., Z. Pinero, E. García, and M.A. Figarella. 2006. Efecto de diferentes métodos de escarificación sobre la germinación de cinco especies de cactáceas (*Opuntia ficus-indica*, *Pilosocereus moritzianus*, *Stenocereus griseus*, *Cereus deficiens* y *Cereus hexagonus*) del Estado Lara. Simposio-Taller: Experiencias en Agroforestería ejecutadas o en proceso por el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA) 1: 13-17
- Delauney, A.J., and D.P.S. Verma. 1993. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant Journal* 4:215-223.
- Flores, J., A. Arredondo, and E. Jurado. 2005. Comparative seed germination in species of *Turbinicarpus*: An endangered cacti genus. *Natural Areas Journal* 25:183-187.
- Flores, J., E. Jurado, and A. Arredondo. 2006. Effect of light on germination of seeds of Cactaceae from the Chihuahuan Desert, México. *Seed Science Research* 16:149-155.
- Flores, J., E. Jurado, and J.F. Jiménez-Bremont. 2008. Breaking seed dormancy in specially protected *Turbinicarpus lophophoroides* and *Turbinicarpus pseudopectinatus* (Cactaceae). *Plant Species Biology* 23:44-47.
- Godínez-Alvarez, H., and A. Valiente-Banuet. 1998. Germination and early seedling growth of Tehuacan Valley cacti species: the role of soils and seed ingestion by dispersers on seedling growth. *Journal of Arid Environments* 39:21-31.
- Ha, H.C., N.S. Sirisoma, P. Kuppusamy, J.L. Zweier, P.M. Woster, and R.A. Casero. 1998. The natural polyamine spermine functions directly as a free radical scavenger. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:11140-11145.
- Jiménez-Bremont, J.F., A. Becerra-Flora, E. Hernández-Lucero, M. Rodríguez-Kessler, J.A. Acosta-Gallegos, and J.G. Ramírez-Pimentel. 2006. Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine. *Biologia Plantarum* 50:763-766.
- Jiménez-Bremont, J.F., O.A. Ruiz, and M. Rodríguez-Kessler. 2007. Modulation of spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. 45:812-821.
- Kavi-Kishor, P.B., S. Sangam, R.N. Amrutha, P. Sri Laxmi, K.R. Naidu, K.R.S.S. Rao, S. Rao, K.J. Reddy, P. Theriappan, and N. Sreenivasulu. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88:424-438.
- Khan, M.J., and I.A. Ungar. 1997. Alleviation of seed dormancy in the desert forb *Zygophyllum simplex* L. from Pakistan. *Annals of Botany* 80:395-400.

- Khedr, A.H.A, M.A. Abbas, A.A.A. Wahid, W.P. Quick, and G.M. Abogadallah. 2003. Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancreaticum maritimum* L. to salt-stress. *Journal of Experimental Botany* 54:2553-2562.
- Korkmaz, A., I. Tiryaki, M.N. Nas, and N. Ozbay. 2004. Inclusion of plant growth regulators into priming solution improves low-temperature germination and emergence of watermelon seeds. *Canadian Journal of Plant Science* 84:1161-1165.
- Korkmaz, A., N. Ozbay, I. Tiryaki, and M.N. Nas. 2005. Combining priming and plant growth regulators improves muskmelon germination and emergence at low temperatures. *European Journal of Horticultural Science* 70:29-34.
- Locke, J.M., J.H. Bryce, and P.C. Morris. 2000. Contrasting effects of ethylene perception and biosynthesis inhibitors on germination and seedling growth of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Experimental Botany* 51:1843-1849.
- Lotter, W.D., L. Thatcher, L. Rossow, and C.F. Reinhardt. 1999. The influence of baboon predation and time in water on germination and early establishment of *Opuntia stricta* (Australian Pest Pear) in the Kruger National Park. *Koedoe* 42:43-50.
- Mandujano, M.C., J. Golubov, and C. Montaña. 1997. Dormancy and endozoochorous dispersal of *Opuntia rastrera* seeds in the southern Chihuahuan Desert. *Journal of Arid Environments* 36:259-266
- Mandujano, M.C., C. Montaña, and M. Rojas-Aréchiga. 2005. Breaking seed dormancy in *Opuntia rastrera* from the Chihuahuan desert. *Journal of Arid Environments* 62:15-21.
- Mandujano, M.C., J. Golubov, and M. Rojas-Aréchiga. 2007. Efecto del ácido giberélico en la germinación de tres especies del género *Opuntia* (Cactaceae) del Desierto Chihuahuense. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 52:46-52.
- Mansour, M.M.F. 2000. Nitrogen containing compounds and adaptation of plants to salinity stress. *Biologia Plantarum*. 43:491-500.
- Neumann P. 1997. Salinity resistance and plant growth revisited. *Plant, Cell and Environment* 20:1193-1198.
- Nolasco, H., F. Vega-Villasante, H.L. Romero-Schmidt, and A. Díaz-Rondero. 1996. The effects of salinity, acidity, light and temperature on the germination of seeds of cardón (*Pachycereus pringlei* (S.Wats) Britton & Rose, Cactaceae). *Journal of Arid Environments* 33:87-94.
- Okçu, G., M. D. Kaya, and M. Atak. 2005. Effects of salt and drought stresses on germination and seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 29:237-242.
- Olivares, O.J., H.A. Chimal, L. Scheinvar, S.D. Montiel, B.P. Zavaleta, and E.G. Ramos 1999. Germinación de semillas de xoconostle duraznillo (*Opuntia leucotricha*), de la región de Fresnillo, Zacatecas. In: Aguirre, R.J.R., and J.A. Reyes-Agüero (Eds.), *Memoria del VIII Congreso Nacional y III Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal*, pp. 32-33, UASLP, San Luis Potosí, México.

- Olvera-Carrillo, Y., J. Márquez-Guzmán, V.L. Barradas, M.E. Sánchez-Coronado, and A. Orozco-Segovia. 2003. Germination of the hard seed coated *Opuntia tomentosa* SD, a cacti from the México valley. *Journal of Arid Environments* 55:29-42.
- Orozco-Segovia, A., J. Márquez-Guzmán, M.E. Sánchez-Coronado, A. Gamboa De Buen, J.M. Baskin, and C.C. Baskin 2007. Seed anatomy and water uptake in relation to seed dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae). *Annals of Botany* 99:581-592.
- Pendley, G.K. 2001. Seed germination experiments in *Opuntia* (Cactaceae) of the Northern Chihuahuan Desert. *Haseltonia* 8:42-50.
- Pilcher, B.L. 1970. Germination of seeds of four species of *Opuntia*. *Cactus and Succulent Journal* 42:281-282.
- Potter, R.L., J.L. Petersen, and D.N. Ueckert. 1984. Germination responses of *Opuntia spp.* to temperature, scarification and other seed treatments. *Weed Science* 32:106-110.
- Prakash, L., and G. Prathapasenan. 1988. Putrescine reduces NaCl-induced inhibition of germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Australian Journal of Plant Physiology* 15:761-767.
- Poljakoff-Mayber, A., G.F. Somers, E. Werker, and J.L. Gallagher. 1994. Seeds of *Kosteletzkya virginica* (Malvaceae): Their structure, germination, and salt tolerance. II germination and salt tolerance. *American Journal of Botany* 81:54-59.
- Reinhardt, C.F., L. Rossouw, L. Thatcher, and W.D. Lotter. 1999. Seed germination of *Opuntia stricta*: implications for management strategies in the Kruger National Park. *South African Journal of Botany* 65:295-298.
- Rodríguez-Kessler, M., A. G. Alpuche-Solís, O.A. Ruiz, and J.F. Jiménez-Bremont. 2006. Effect of salt stress on the regulation of maize (*Zea mays* L.) genes involved in polyamine biosynthesis. *Plant Growth Regulation* 48:175-185.
- Rodríguez-Kessler M., O.A. Ruiz, S. Maiale, J. Ruiz-Herrera, and J.F. Jiménez-Bremont. 2008. Polyamine metabolism in maize tumors induced by *Ustilago maydis*. *Plant Physiology and Biochemistry*. In press, doi:10.1016/j.plaphy.2008.05.012.
- Rojas-Aréchiga, M., and C. Vázquez-Yanes. 2000. Cactus seed germination: A review. *Journal of Arid Environments* 44:85-104.
- Romero-Schmidt, H.L., F. Vega-Villasante, H. Nolasco, and C. Montaña. 1992. The effect of darkness, freezing, acidity and salinity on seed germination of *Ferocactus peninsulæ* (Cactaceae). *Journal of Arid Environments* 23:389-395.
- Sairam, R.K., and A. Tyagi. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science* 86:407-418.
- Sánchez-Venegas, G. 1997. Germinación, viabilidad y características distintivas de la semilla de *Opuntia joconostle* Weber, forma Cuaresmero. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 42:16-21.

- Santanen, A., and L.K. Simola. 1999. Metabolism of L[U⁻¹⁴C]-arginine and L[U⁻¹⁴C]-ornithine in maturing and vernalised embryos and megagametophytes of *Picea abies*. *Physiologia Plantarum* 107:433-440.
- Sińska, I., and U. Lewandowska. 1991. Polyamines and ethylene in the removal of embryonal dormancy in apple seeds. *Physiologia Plantarum* 81:59-64.
- Silva-Ortega, C.O., A.E Ochoa-Alfaro, J.A. Reyes-Agüero, G.A. Aguado-Santacruz, and J.F. Jiménez-Bremont. 2008. Salt stress increases the expression of P5CS gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiology and Biochemistry* 46:82-92.
- Silverstein, R.P. 2005. Germination of native and exotic plant seeds dispersed by coyotes (*Canis latrans*) in Southern California. *Southwestern Naturalist* 50:472-478.
- Smith, T.A. 1985. Polyamines. *Annual Review Plant Physiology* 36:117-143.
- Smreciu, E.A., R.S. Currah, and E. Toop. 1988. Viability and germination of herbaceous perennial species native to Southern Alberta grasslands. *Canadian Field Naturalist* 102:31-38.
- Sokal, R. R., and J. H. Rohlf. 1995. *Biometry: the principles and practice of statistics in biological research*, 3rd edition. W.H. Freeman, New York. 887 pp.
- Tiburcio, A.F., R.T. Besford, T. Capell, A. Borrell, P.S. Testillano, and M.C. Risueno. 1994. Mechanism of polyamine action during senescence responses induced by osmotic stress. *Journal of Experimental Botany* 45:1789-1800.
- Timmons, F.L. 1942. The dissemination of prickly pear seed by jack rabbits. *Journal of the American Society of Agronomy* 34:513-520.
- Vega-Villasante, F., H. Nolasco, C. Montaña, H. Romero-Schmidt, and E. Vega-Villasante. 1996. Efecto de la temperatura, acidez, iluminación, salinidad, irradiación solar y humedad sobre la germinación de semillas de *Pachycereus pecten-aboriginum* "cardón barbón" (Cactaceae). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 41:51-60.
- Wang, X., P. Felker, A. Paterson, Y. Mizrahi, A. Nerd, and C. Mondragón-Jacobo. 1996. Cross-hybridization and seed germination in *Opuntia* species. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 1:49-60.
- Wiggins, I.L., and D.W. Focht. 1967. Seeds and seedlings of *Opuntia echios* J. T. Howell var. *gigantea* Dawson. *Cactus and Succulent Journal* 39:26-30.
- Yamaguchi, K., Y. Takahashi, T. Berberich, A. Imai, A. Miyazaki, T. Takahshi, A.J. Michael, and T. Kusano. 2006. The polyamine spermine protects against high salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 580:6783-6788.
- Yamaguchi, K., Y. Takahashi, T. Berberich, A. Imai, T. Takahashi, A.J. Michael, and T. Kusano. 2007. A protective role for the polyamine spermine against drought stress in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352:486-490.
- Zapata, P.J., M. Serrano, M.T. Pretel, A. Amorós, and M.A. Botella. 2004. Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. *Plant Science* 167:781-788.

Zeid, I.M., and Z.A. Shedeed. 2006. Response of alfalfa to putrescine treatment under drought stress. *Biologia Plantarum* 50:635-640.

Zhao, F., C. Song, J. He, and H. Zhu. 2007. Polyamines improve K⁺/Na⁺ homeostasis in barley seedlings by regulating root ion channel activities. *Plant Physiology* 145:1061-1072.

Zhu, J.K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6:66-71.

Zhu, H., G.H. Ding, K. Fang, F.G. Zhao, and P. Qin. 2006. New perspective on the mechanism of alleviating salt stress by spermidine in barley seedlings. *Plant Growth Regulation* 49:147-156.

Table 1. *Opuntia* species with seed dormancy.

Species	Authors
<i>O. atrispina</i>	Pendley (2001)
<i>O. auranthiaca</i>	Archibald (1939)
<i>O. camanchica</i>	Pendley (2001)
<i>O. chisoensis</i>	Pendley (2001)
<i>O. compressa</i>	Baskin and Baskin (1977)
<i>O. decumbens</i>	Godínez-Álvarez and Valiente-Banuet (1998)
<i>O. discata</i>	Potter (1984)
<i>O. echios</i> var. <i>gigantea</i>	Wiggins and Focht (1968)
<i>O. edwardsii</i>	Potter <i>et al.</i> (1984)
<i>O. engel</i>	Pendley (2001)
<i>O. engelmannii</i>	Potter <i>et al.</i> (1984); Pendley (2001)
	Wang <i>et al.</i> (1996); Altare <i>et al.</i> (2006); D'Aubeterre <i>et al.</i> (2006)
<i>O. ficus-indica</i>	
<i>O. humifusa</i>	Cook (1942)
<i>O. imbricata</i>	Pilcher (1970)
<i>O. joconostle</i>	Sánchez-Venegas (1997)
<i>O. kleiniae</i>	Pilcher (1970)
<i>O. leucotricha</i>	Olivares <i>et al.</i> (1999)
<i>O. lindheimeri</i>	Pilcher (1970); Potter <i>et al.</i> (1984)
<i>O. littoralis</i>	Silverstein (2005)
<i>O. macrocentra</i>	Mandujano <i>et al.</i> (2007)
<i>O. macrorhiza</i>	Timmons (1942)
<i>O. microdasys</i>	Mandujano <i>et al.</i> (2007)
<i>O. poly</i>	Pendley (2001)
<i>O. polyacantha</i>	Smreciu <i>et al.</i> (1988)
<i>O. rastrera</i>	Mandujano <i>et al.</i> (1997, 2005)
<i>O. spinossibacca</i>	Pendley (2001)
<i>O. streptacantha</i>	This study
<i>O. stricta</i>	Lotter <i>et al.</i> (1999); Reinhardt <i>et al.</i> (1999)
<i>O. tomentosa</i>	Olvera-Carrillo <i>et al.</i> (2003), Orozco-Segovia <i>et al.</i> (2007)

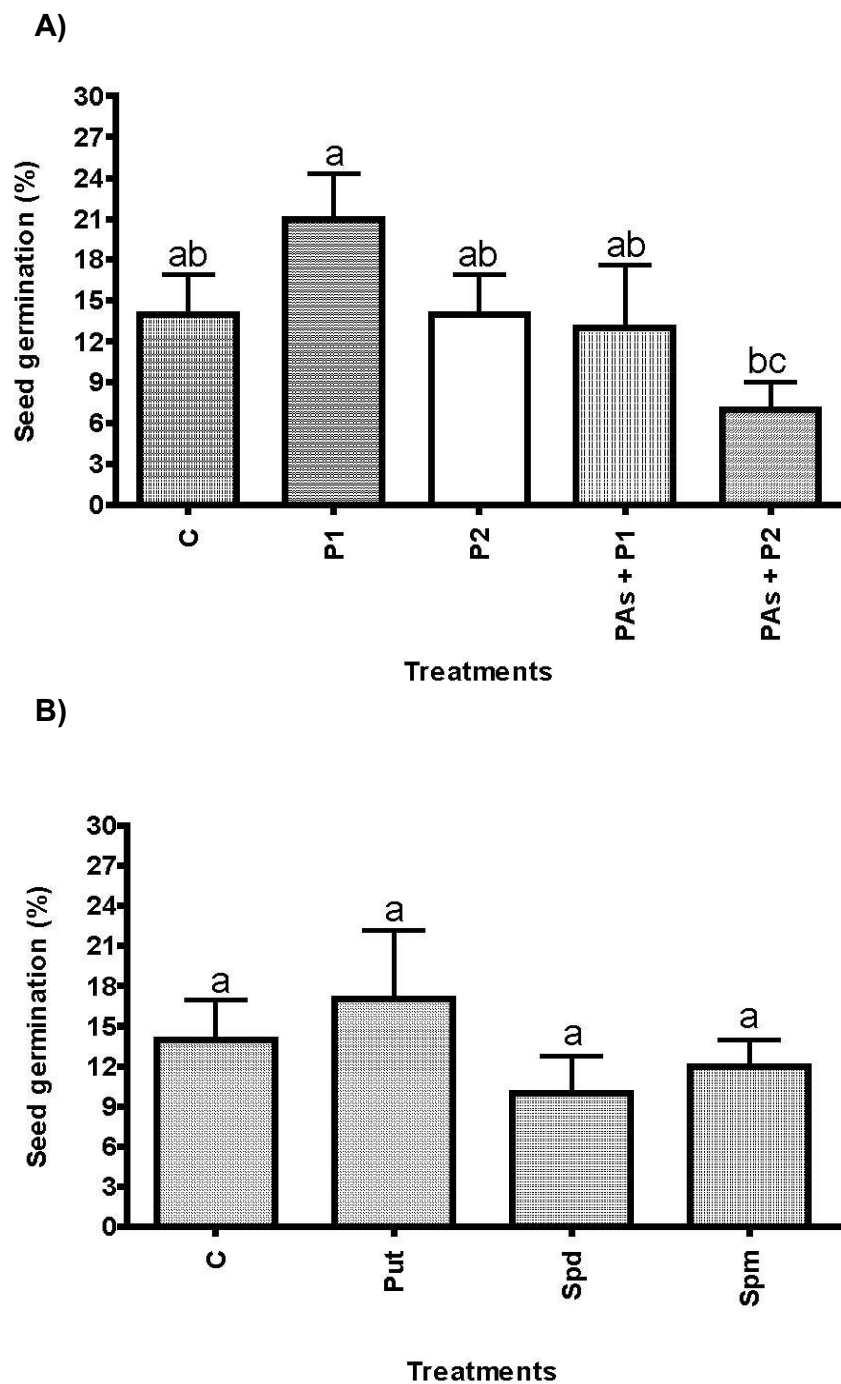


Figure 1. 1A) Germination percentage (Means \pm SE) of *O. streptacantha* seeds with 1 and 10 mM Pro and with a mixture of PAs (1 μ M: Put, Spd and Spm).

C = Untreated seeds (Control), PAs (Polyamines) = Put (Putrescine), Spd (Spermidine) and Spm (Spermine) mix, P1 = 1mM Pro (Proline), and P2 = 10 mM Pro (Proline).

1B) Germination percentage (Means \pm SE) with each PAs.

Different letters represent significant differences between treatments.

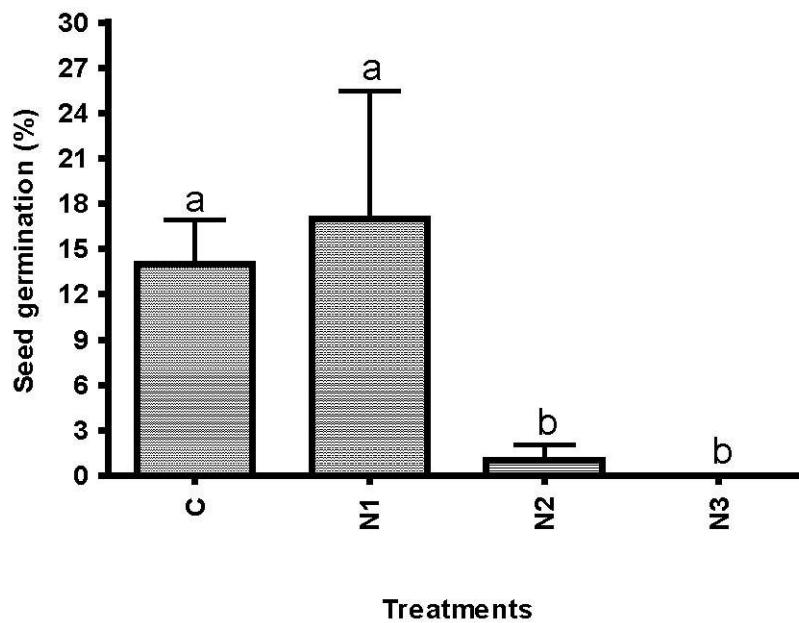


Figure 2. Germination percentage (Means \pm SE) of *O. streptacantha* seeds under salt stress. C = Untreated seeds (Control), N1 = 25 mM NaCl, N2 = 50 mM NaCl, and N3 = 75 mM NaCl. Different letters represent significant differences between treatments.

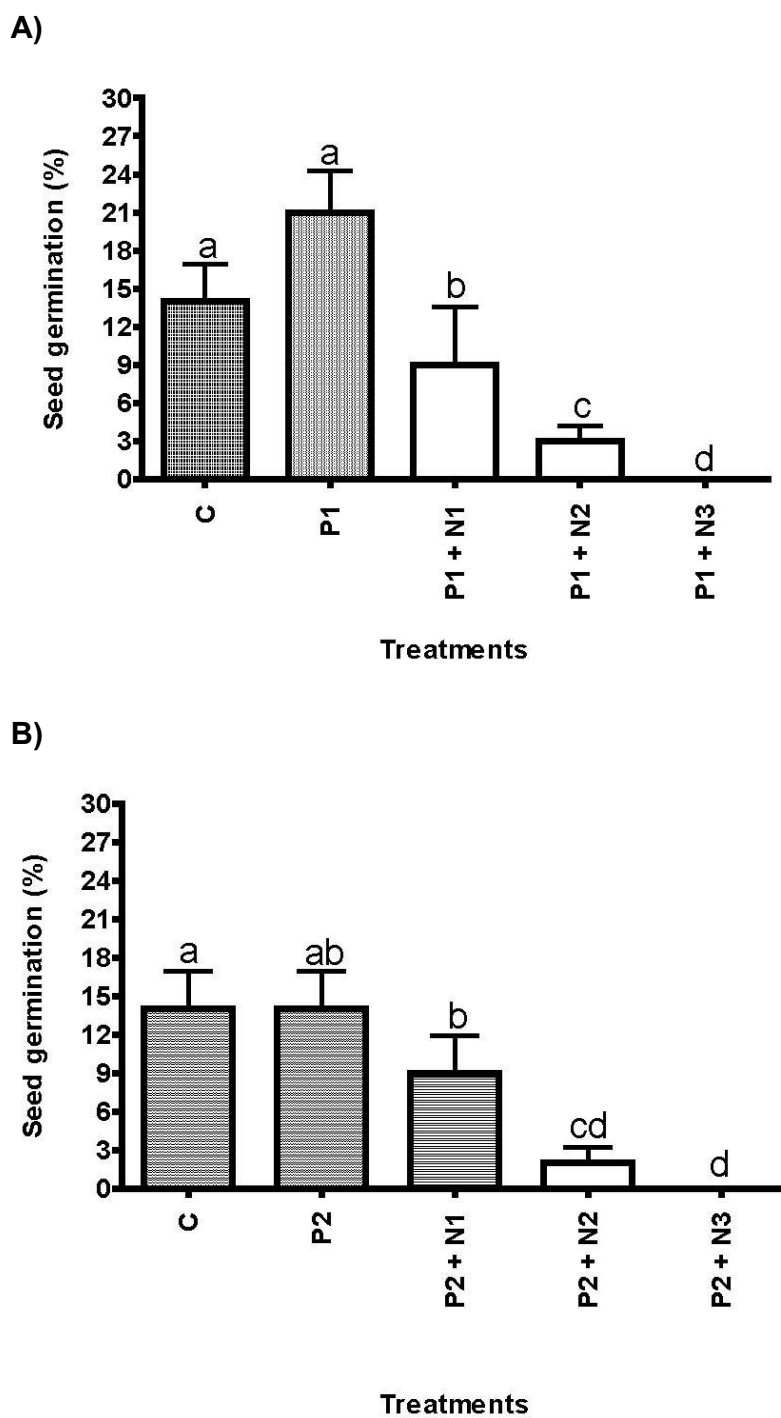


Figure 3. Germination percentage (Means \pm SE) of *O. streptacantha* seeds under salt stress with exogenous added 1 mM (Fig. 3A) and 10mM (Fig. 3B) of Pro (Proline). C = Untreated seeds (Control), P1 = 1 mM Pro, P2 = 10 mM Pro, N1 = 25 mM NaCl, N2 = 50 mM NaCl, and N3 = 75 mM NaCl.

Different letters represent significant differences between treatments.

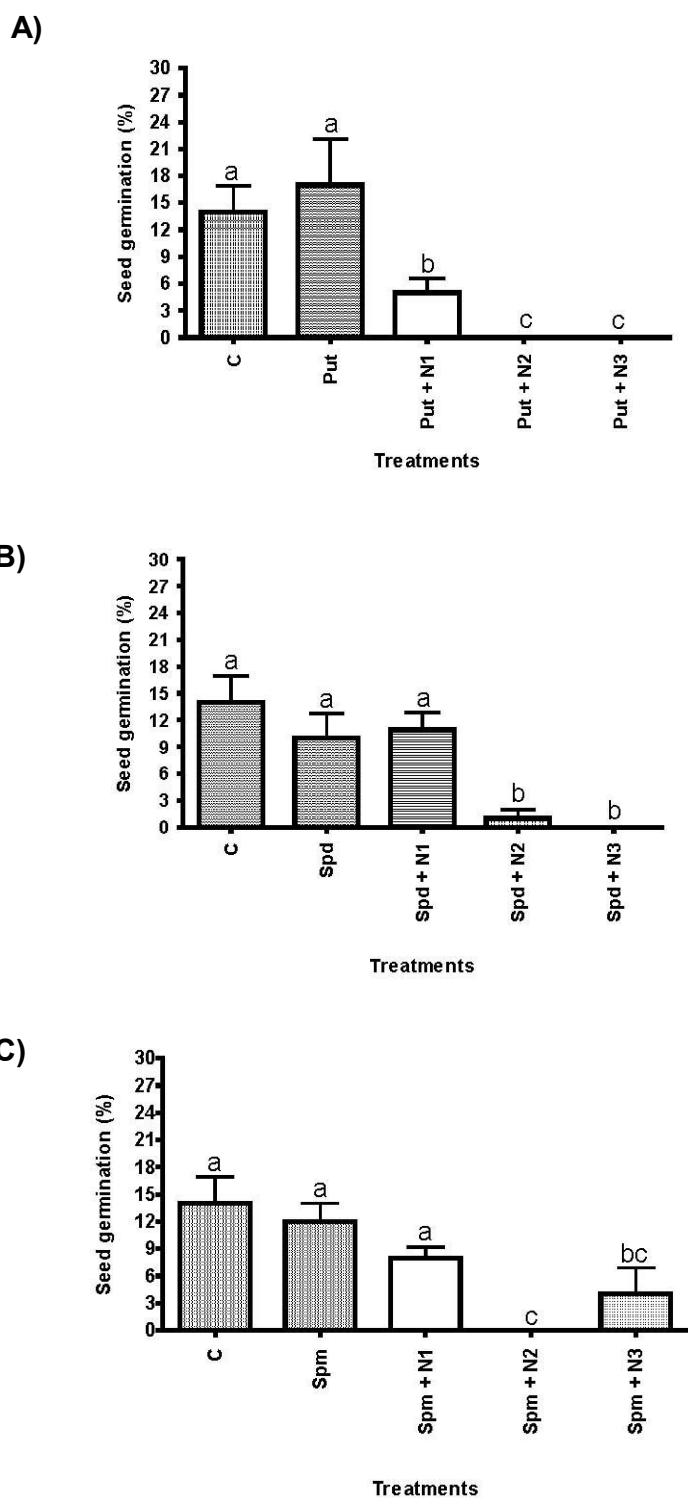


Figure 4. Germination percentage (Means \pm SE) of *O. streptacantha* seeds under salt stress with exogenous added PAs: Put (Fig. 4A), Spd (Fig. 4B), or Spm (Fig. 4C).

C = Untreated seeds (Control), Put = 1 μ M Putrescine, Spd = 1 μ M Spermidine, Spm = 1 μ M Spermine, N1 = 25 mM NaCl, N2 = 50 mM NaCl, and N3 = 75 mM NaCl.

Different letters represent significant differences between treatments.

Capítulo 2

Caracterización funcional de una dehidrina tipo SK₃ aislada de una biblioteca de cDNA de *Opuntia streptacantha* sometida a estrés abiótico.

En este trabajo se realizó inicialmente una biblioteca de cDNA de nopal sometida a diversas condiciones de estrés, con la finalidad de identificar aquellos genes que son inducidos en respuesta al estrés. Para construir dicha biblioteca se utilizaron plantas de un año de edad que fueron sometidas a una mezcla de diferentes tipos de estrés que fueron: a) salinidad (NaCl a 250 mM), b) calor (40 °C) y salinidad, c) frío, d) calor y frío, e) calor y sequía, f) sequía, calor y frío. Una vez obtenido el RNA de cada una de las tratamientos se procedió a la construcción de la biblioteca mediante el kit Creator™ Smart™ cDNA library Construction. De dicha biblioteca se obtuvieron 329 unigenes que provienen de 442 clonas seleccionadas al azar. Se seleccionó el unigen (*OpsDHN1*) que codifica una dehidrina de nopal, para su caracterización, ya que fue el EST más abundante de las 442 clonas de la biblioteca. El cDNA del gen *OpsDHN1* tiene un tamaño de 905 pb, con 747 pb del marco de lectura abierto (ORF), y hacia el 5'UTR tiene 76 pb, y 82 pb corresponden al 3'UTR; el cual codifica para una dehidrina de tipo SK₃ de 248 aminoácidos. Además se aisló la secuencia del DNA genómico correspondiente al cDNA completo del gen *OpsDHN1*. Al comparar la secuencia genómica con la secuencia de cDNA del gen *OpsDHN1* resultó la presencia de un intrón de 234 pb en el ORF de dicho gen.

Mediante análisis de qRT-PCR se observó que la mayor inducción del transcrito *OpsDHN1* en plantas de nopal de 1 año de edad fue en respuesta a estrés por frío (4 °C durante 17 días). Adicionalmente, encontramos una inducción en la expresión del gen *OpsDHN1* con la aplicación exógena de ABA a plantas de nopal de 3 meses de edad de una manera dependiente de concentración y tiempo. Por otro lado se generaron líneas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresan el gen *OpsDHN1* de nopal mediante la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, con la finalidad de estudiar los fenotipos de dichas sobreexpresantes del gen *OpsDHN1* en *A. thaliana* bajo condiciones de estrés.

Para esto las plantas transgénicas fueron sometidas estrés por congelamiento (-15 °C por 2 h, y después un período de aclimatación de 4 °C por 12 h) y a estrés por NaCl (150 mM). Dichos resultados demostraron que la tasa sobrevivencia de las líneas transgénicas fue más alta en la recuperación después del estrés por congelamiento (aprox. 3 veces) en comparación a las plantas Col-0; sin embargo con el tratamiento con NaCl no se observaron diferencias en la tasa de sobrevivencia entre las sobreexpresante y la parental (Col-0). Nuestros resultados sugieren que esta dehidrina de nopal (OpsDHN1) está involucrada en los mecanismos de respuesta a las condiciones de estrés por congelamiento.

Nota: Cabe mencionar que el experimento realizado con NaCl en las plantas transgénicas forma parte de la tesis de la maestría de la bióloga Ma. Beatriz Pérez Morales.



Functional characterization of a SK3 dehydrin isolated from an abiotic-treated *Opuntia streptacantha* cDNA library

Journal:	<i>Planta</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Ochoa-Alfaro, Ana; IPICYT, Molecular Biology Rodriguez-Kessler, Margarita; IPICYT, Molecular Biology Pérez-Morales, Maria; IPICYT, Molecular Biology Cuevas, Cesar; IPICYT, Molecular Biology Gómez-Anduro, Gracia; Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, Agricultura en Zonas Áridas Jimenez-Bremont, Juan; Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), Molecular biology
Keywords:	abiotic stress, cactus pear, dehydrin, cDNA library, cold stress, intron

SCHOLARONE™
Manuscripts

Full title:

Functional characterization of a SK₃ dehydrin isolated from an abiotic-treated *Opuntia streptacantha* cDNA library

Running title:

Opuntia cDNA library

A. E. Ochoa-Alfaro¹, M. Rodríguez-Kessler¹, M. B. Pérez-Morales¹, C.L. Cuevas-Velazquez¹, G. Gómez-Anduro² and J. F. Jiménez-Bremont^{1*}

¹*División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa de San José 2055, Apartado Postal 3-74 Tangamanga, 78216, San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.*

²*Agricultura en Zonas Áridas, Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, Apartado Postal 128 La Paz, BCS 23090, México.*

* Author for correspondence; phone: (+52) 444-8-342000; fax: (+52) 444-8-342010, email: jbremont@ipicyt.edu.mx

Key-words: Abiotic stress; cactus pear; cDNA library; dehydrin; cold stress; intron.

Abbreviations: ABA - abscisic acid; CAM - crassulacean acid metabolism; ORF - open reading frame; *OpsDHNI* - *Opuntia streptacantha dehydrin 1*; qRT-PCR - quantitative reverse transcriptase - polymerase chain reaction.

1
2
3 24
4 25 **ABSTRACT**

5
6 26 Cactus pears are succulent plants of the Cactaceae family adapted to extreme arid and hot environments,
7
8 27 making them an excellent model for the study of molecular mechanisms underlying abiotic stress tolerance.
9
10 28 Here in, we report a directional cDNA library from one-year-old cladodes of *Opuntia streptacantha* plants
11
12 29 subjected to abiotic stresses. A total of 442 clones were sequenced, representing 329 cactus pear unigenes,
13
14 30 classified into eleven functional categories. The most abundant EST (unigen 33) was characterized under
15
16 31 abiotic stress. This cDNA of 905 bp encodes a SK₃-type acidic dehydrin of 248 amino acids. The *OpsDHN1*
17
18 32 gene contains an intron inserted within the sequence encoding the S-motif. Presence of introns and their
19
20 33 insertion within codons in other plant dehydrins is discussed. qRT-PCR analysis showed that the *OpsDHN1*
21
22 34 transcript is specifically accumulated in response to cold, and induced by ABA. Over-expression of the
23
24 35 *OpsDHN1* gene in *Arabidopsis* leads to enhanced tolerance to freezing treatment, suggesting that *OpsDHN1*
25
26 36 participates in the freezing stress responsiveness. Generation of the first EST collection for the
27
28 37 characterization of cactus pear genes constitutes a useful platform for the understanding of *Opuntia* and other
29
30 38 CAM plants molecular mechanisms of stress tolerance.
31

32 39
33 40
34 41
35 42
36 43
37 44
38 45
39 46
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 47
4 48 **INTRODUCTION**

5
6 49 *Opuntia* spp. has become important in the semiarid areas of Mexico, where it plays a strategic role in
7
8 50 subsistence agriculture (Pimienta-Barrios 1994). Cactus pear is edible as a fruit and vegetable, and also is
9
10 51 used for medicinal purpose, and as a forage crop. *Opuntia* spp. plants have a crassulacean acid metabolism
11
12 52 (CAM) which is a photosynthetic adaptation that facilitates night CO₂ uptake and thereby water use efficiency
13
14 53 of carbon assimilation is optimized. The great capacity to reduce water loss is also associated to
15
16 54 morphological adaptations such as the globular or racquet-like structures known as cladodes, which store
17
18 55 large amounts of water, the replacement of leaves by thorns, thick cuticle cladode, low stomatal frequency
19
20 56 and sunken stomata (Nobel and Bobich 2002; Rabas and Martin 2003). Because of this and its tolerance to
21
22 57 drought, this plant can adapt to a variety of climatic conditions (Cushman 2001; Lüttge 2004). Environmental
23
24 58 stress conditions (drought, extreme temperature and high salinity) negatively influence plant distribution,
25
26 59 survival, and crop yields worldwide. It has been estimated that arable lands will become unproductive as a
27
28 60 result of salinity and drought by the year 2050 (Wang et al. 2003). These stress factors induce several
29
30 61 physiological, biochemical and molecular changes in plants (Wang et al. 2001). Among them, changes in
31
32 62 gene expression and metabolism leading to osmotic adjustment, induction of repair systems and chaperones,
33
34 63 and expression of late embryogenesis abundant (LEA) proteins have been described (Ingram and Bartels
35
36 64 1996; Thomashow 1999; Tunnacliffe and Wise 2007).

37
38 65 Dehydrins (DHNs), which belong to the group 2 of LEA proteins, accumulate during the late stages of
39
40 66 embryogenesis and in response to abiotic stresses. Transcriptional regulation of *DHN* genes in response to
41
42 67 stress have been reported for different plant species including *Capsicum annuum* (Chung et al. 2003), *Boea*
43
44 68 *crassifolia* (Shen et al. 2004), *Oryza sativa* (Lee et al. 2005), *Capsella bursa-pastoris* (Fan and Wang 2006),
45
46 69 *Triticum durum* (Brini et al. 2007), *Triticum aestivum* L. (Shakirova et al. 2009), *Populus alba* x *P.temula* var.
47
48 70 *glandulosa* (Bae et al. 2009) and *Prunus persica* L. (Basset et al. 2009). Most of the RAB (Responsive to
49
50 71 Abscisic Acid) and COR (Cold-Regulated) proteins belong to this group (Nylander et al. 2001). Furthermore,
51
52 72 dehydrins have been proposed as transcriptional markers of cold stress in tomato (Weiss and Egea-Cortines
53
54 73 2009).

55
56 74 The family of DHN proteins is characterized by the presence of typical and conserved motifs: the K-, S-, Y-,
57
58 75 and \emptyset -segments. The K-segment is a highly conserved lysine-rich consensus region that consists of 15 amino

1
2
3 76 acid residues (EKKGIME/DKIKEKLP), which form a putative amphipathic α -helix (Close 1996, 1997;
4
5 77 Allagulova et al. 2003; Kosová, et al. 2010). This structure allows both hydrophilic and hydrophobic
6
7 78 interactions to stabilize proteins in water stress environments (Dure 1993). The S-segment is formed by a
8
9 79 stretch of 4-10 serine residues, which are a part of a conserved sequence LHRSGS₄₋₁₀(E/D)₃ (Kosová, et al.
10
11 80 2010). It has been suggested that phosphorylation of this motif is related to nuclear transport through the
12
13 81 interaction with specific signal peptides (Close 1996, 1997; Allagulova et al. 2003; Shen et al. 2004). The Y-
14
15 82 segment [(V/T) D(E/Q)YGNP] is located near to the N-terminus, and shares certain degree of homology with
16
17 83 a portion of the nucleotide binding site of plant and bacteria chaperones (Close 1996). The ϕ -segment is a less
18
19 84 conservative region enriched with polar amino acids, especially threonine and glycine, and is interspersed
20
21 85 between K-segments (Campbell and Close 1997; Close 1997; Allagulova et al. 2003; Battaglia et al. 2008).
22
23 86 DHNs proteins are localized in several cellular compartments including the cytoplasm, plasma membrane,
24
25 87 nucleus, and mitochondria (Close 1996, 1997; Borovskii et al. 2002). The precise functions of each subtype of
26
27 88 dehydrin are still unknown. However, *in vitro* studies have revealed that these proteins bind to lipid vesicles
28
29 89 that contain acidic phospholipids through the K-segment (Koag et al. 2003; Kovacs et al. 2008). DHN also
30
31 90 bind metals such as Cu⁺², Ca⁺² and Zn⁺² through specific sequences containing histidine residues or by means
32
33 91 of the phosphorylation of serine residues (Heyen et al. 2002; Alsheikh et al. 2003; Hara et al. 2005; 2009). In
34
35 92 addition, the cryoprotective activity of DHNs has been described for several freezing-sensitive enzymes such
36
37 93 as catalase, lactate dehydrogenase and malate dehydrogenase (Hara et al. 2001; Reyes et al. 2005). Moreover,
38
39 94 DHNs have been described to act as chaperons preventing the heat-induced aggregation and/or inactivation of
40
41 95 various proteins (Kovacs et al. 2008).
42
43 96 *Opuntia* species have been important for the understanding of plant ecophysiology; however, few studies at
44
45 97 the molecular level exist (Nobel 1997; Griffith 2004; Silva-Ortega et al. 2008). In this paper, we report the
46
47 98 construction of a directional cDNA library of *Opuntia streptacantha* cladodes containing a collection of ESTs
48
49 99 accumulated under a combination of abiotic stresses. Here, the molecular and functional characterization of
50
51 100 the unigene 33, encoding an SK₃-type acid dehydrin, and its role in plant freezing stress recovery is presented.
52
53 101 The EST data generated in this study can assist to the establishment of cactus pear as a CAM model system
54
55 102 for molecular biology studies.
56
57 103

104 **Materials and Methods**

105 **Plant material and growth conditions**

106 *Opuntia streptacantha* seeds were collected from the “Cardona” cactus pear variety growing in the region of
107 Villa de Zaragoza in the state of San Luis Potosi, Mexico. Seeds were sterilized with 30% (v/v) commercial
108 sodium hypochloride (6% free chlorine) solution for 30 min, with 70% (v/v) ethanol for 4 min, and rinsed three
109 times in sterile distilled water after each treatment. Aseptic seeds were germinated in a seed germination bed
110 and grown in a commercial soil mixture substrate (Cosmocel, Monterrey, Mexico) in plastic pots. Young
111 cactus pear plants were maintained in a growth chamber at $25 \pm 2^\circ\text{C}$ under a 12 h (light/dark) photoperiod.

112 The Columbia ecotype (Col-0) of *Arabidopsis thaliana* was used for the generation of transgenic plants.
113 Seeds were sterilized with 20% (v/v) commercial sodium hypochloride (6% free chlorine) solution for 8 min,
114 and rinsed seven times in sterile distilled water. Aseptic seeds were germinated in plastic Petri dishes
115 containing Murashige and Skoog (MS) medium (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) supplemented with 0.6%
116 agar and 2% sucrose. Plates were kept at 4°C for 2 d and then incubated at 22°C during 7 d in a growth
117 chamber under a 16-h light/8-h dark photoperiod. Plants were grown to maturity in soil pots in a growth
118 chamber at 22°C with a 16/8-h photoperiod.

119

120 **Abiotic stress treatments**

121 Depending on the experiment, one-year-old *O. streptacantha* plants were grown either in a commercial soil
122 mixture (Cosmocel, Monterrey, Mexico) or in semi-hydroponic conditions for the application of salt stress
123 treatment. In total, six different stress treatments were applied: salinity (N), heat-salinity (HN), cold (C), heat-
124 cold (HC), heat-drought (HD) and drought-heat-cold (DHC), as described below.

125 Salt stress experiments (N) were conducted in a semi-hydroponic system, using pots filled with a mixture of
126 sand and agrolite (3:1), sub-irrigated with half strength Hoagland’s nutrient solution containing 0 or 250 mM
127 NaCl (Hoagland and Arnon 1950). Pots, each containing one plant, were maintained in growth chambers
128 under a 12 h (light/dark) photoperiod, at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. In addition, other salt stress experiments (250 mM NaCl)
129 were conducted in combination with heat stress (40°C , HN).

130 For the rest of the stress experiments plants were grown in a commercial soil mixture. Cold stress (C)
131 treatments were conducted at 4°C under a 12 h (light/dark) photoperiod, watering the plants every 2 d.

1
2
3 132 Another experiment consisted in a mixture of cold (4°C/night) and heat (40°C/day) stress (HC) treatments, in
4
5 133 which a set of plants were watered every 2 d and another set (DHC) was let without irrigation during the
6
7 134 entire experiment. Finally, heat stress (40°C) treatments without irrigation were also conducted (HD). All
8
9 135 stress treatments were applied for 17 d. After each treatment cladodes were transferred to liquid nitrogen for
10
11 136 subsequent total RNA isolation and used as starting material for the cDNA library construction and qRT-PCR
12
13 137 analysis.
14

15 138

17 139 **Abscisic acid treatments**

18
19 140 Three-month-old *O. streptacantha* young plants were grown under semi-hydroponic conditions, adding
20
21 141 concentrations of 0, 0.1 and 100 µM ABA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) to the Hoagland's nutrient
22
23 142 solution. To avoid ABA photodegradation, the semi-hydroponic system was covered with aluminium foil.
24
25 143 After 1.5, 6 and 12 h of treatment, cladodes were transferred to liquid nitrogen for total RNA isolation.
26

27 144

29 145 **Generation of a cactus pear cDNA library**

30
31 146 A full length, directionally cloned cDNA library was constructed from one-year-old cladodes of *O.*
32
33 147 *streptacantha* plants subjected to several abiotic stresses (heat, cold, salinity and drought). A total of six stress
34
35 148 treatments (N, HN, C, HC, HD and DHC) were carried out as described previously, and total RNA from
36
37 149 cladodes was extracted according the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) protocol. For cDNA
38
39 150 synthesis and subsequent library construction, one µg of a mixture of total RNAs obtained from the six stress
40
41 151 treatments was used following the recommendations of the Creator™ Smart™ cDNA library Construction
42
43 152 Kit (Clontech, Palo Alto, CA). Double stranded cDNA greater than 500 bp were cloned directionally into the
44
45 153 pDNR-LIB vector (Clontech, Palo Alto, CA). TOP10 electrocompetent cells (Invitrogen, Carlsbad, USA)
46
47 154 were transformed and plasmids of individual clones were obtained using the alkaline lysis procedure
48
49 155 (Sambrook et al. 1989). Positive clones containing inserted fragments were identified by colony-PCR and
50
51 156 sequenced. The nucleotide sequences of the *O. streptacantha* cDNA library were deposited at the NCBI
52
53 157 GenBank database under the accession numbers HO058618 - HO058946.
54

55 158

159 RNA isolation and qRT-PCR analysis

160 Total RNA was isolated from *O. streptacantha* cladodes using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden,
161 Germany), and RNA concentration was measured before and after treatment with DNase I (Invitrogen,
162 Carlsbad, USA) with a NanoDrop ND-1000 UV-Vis spectrophotometer (NanoDrop Technologies) according
163 to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis and quantitative PCR analysis were performed using the
164 iScript™ One- Step RT-PCR kit with SYBR® Green (Bio-Rad, Laboratories, Inc.). The reaction mixture in a
165 total volume of 25 µL contained 50 ng of total RNA, 12.5 µL of 2x SYBR Green RT-PCR reaction mix, 200
166 nM of each oligonucleotide (see Table I) and 1 µL of iScript MMLV reverse transcriptase (Bio-Rad,
167 Laboratories, Inc.). Real-time one-step RT-PCR conditions were 10 min at 50°C (cDNA synthesis), 5 min at
168 95°C (iScript MMLV reverse transcriptase inactivation), followed by 40 PCR cycles of 10 s at 95°C
169 (denaturation) and 30 s at 60°C (oligonucleotide annealing/extension). Melting curves were performed by 80
170 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 55°C and 10 s at 55°C, increasing the temperature by 0.5°C per cycle using
171 the iQ5 Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Laboratories, Inc). Analyses were performed by
172 triplicate. Data were analyzed with the iQ5 Optical System Software (Bio-Rad, Laboratories, Inc.).
173 Quantification of the *OpsDHN1* gene, expressed as normalized fold expression, compared mRNA levels
174 (stress condition or ABA treatments) with un-treated controls and, was calculated after normalization to the
175 *O. streptacantha* elongation factor gene (*OpsEF1*; accession no. HM581972) using the comparative threshold
176 cycle method (Livak and Schmittgen 2001).

178 Isolation of a genomic fragment of the cactus pear dehydrin (*OpsDHN1*)

179 Genomic DNA was extracted from cladodes of three-month-old *O. streptacantha* plants using the DNeasy
180 Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). In order to amplify a genomic fragment of the *OpsDHN1* gene, a
181 set of oligonucleotides 5gOpsDHN1 and 3gOpsDHN1 (see Table I) were designed based on the full length
182 cDNA sequence identified in the cDNA library. PCR amplification conditions were as follows: 5 min at 94°C
183 followed by 35 cycles of 60 s at 94°C, 60 s at 59°C and 2 min at 72°C and finally 7 min at 72°C. The obtained
184 PCR product of 1133 bp was cloned into the pCR4-TOPO vector (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen,
185 Carlsbad, USA) and sequenced on both strands. The genomic sequence reported in this paper appears at the
186 GenBank under the accession number HM581971.

187 **Generation of transgenic Arabidopsis plants**

188 The ORF sequence and 76 bp of the 3'-UTR region of the dehydrin cDNA (*OpsDHNI*) was amplified using
189 the oligonucleotides 5OpsDHNORF and 3OpsDHNUTR (Table I). The ORF was cloned into the
190 pCR@8/GW/TOPO (Invitrogen, Carlsbad, USA) entry vector and then subcloned into the pMDC32
191 expression vector by site-specific recombination using Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen,
192 Carlsbad, CA). Agrobacterium-mediated transformation was performed via the floral dipping method of *A.*
193 *thaliana* (ecotype Columbia). Transgenic plants were selected by plating seeds on plant nutrient agar plates
194 supplemented with 50 µg/ml hygromycin and the T2 generation transgenic plants (*35S::OpsODHNI*) were
195 transferred into soil. Homozygous lines were analyzed following the segregation of the hygromycin resistance
196 (T3). Expression of the *OpsDHNI* gene in *A. thaliana* was evaluated by semi-quantitative RT-PCR using one
197 µg of total RNA for first strand cDNA synthesis following the SuperScript™ First-Strand Synthesis System
198 for RT-PCR (Invitrogen, Carlsbad, USA), as described previously (Rodríguez-Kessler et al. 2008). As loading
199 control the *OpsEF1* product was used.

200

201 **Freezing stress treatments of *OpsDHNI* transgenic Arabidopsis plants**

202 One month-old wild-type (Col-0) and three *35S::OpsDHNI* (1-3) transgenic plants (homozygous lines T3)
203 were grown in soil in a growth chamber ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), under a photoperiod of 16 h light/8 h dark and then
204 incubated at 4°C for 12 h for cold acclimation. After the acclimation period, the plants were frozen for 2 h at -
205 15°C and sprayed with ice-cold water to induce ice formation, after freezing 10/10 (Col-0/*35S::OpsDHNI-1*)
206 plants were thawed to 4°C for 12 h and transferred to a growth chamber for recovery under optimal growth
207 conditions. Plant survival rate was calculated after a period of 21 d and plant photographs were taken. Data
208 are mean \pm SE (n=10) from five replicates. This experiment was repeated threefold obtaining similar results.

209

210 **NaCl stress treatment of *OpsDHNI* transgenic Arabidopsis plants**

211 Three week-old wild-type (Col-0) and *35S::OpsDHNI-1* transgenic plants (homozygous lines T3) grown *in*
212 *vitro* on MS Petri dishes in a growth chamber ($22 \pm 2^\circ\text{C}$; 16 h light/8 h dark regimen), were transferred to MS
213 plates supplemented with 150 mM NaCl. After 15 d of stress treatments, 10/10 (Col-0/*35S::OpsDHNI-1*)
214 plants were transferred for recovery to plastic pots containing a commercial soil mixture substrate and

1
2
3 215 irrigated every 4 d. Plant survival rate was calculated after 21 d NaCl treatment, and photographs of each
4
5 216 experiment were taken. Data are mean \pm SE (n=10) from five replicates. These stress experiments were
6
7 217 repeated twice obtaining similar results.
8

9 218

11 219 **Nucleic acid sequencing and analysis**

12
13 220 DNA sequencing was conducted with double stranded templates in an ABI PRISM 377 DNA automated
14
15 221 sequencer (Perkin Elmer). All nucleic acid sequences were screened for vector contamination using the
16
17 222 Vector Screen program (www.ncbi.nlm.nih.gov/Vescreen) and grouped into contigs (group of overlapping
18
19 223 DNA sequences) using the SeqMan program (DNASTAR, Madison, WI). Homology searches were
20
21 224 conducted using the BLAST program (BLASTN and BLASTX) in two databases [GenBank non-redundant
22
23 225 (nr) and EST] of the National Center of Biotechnology Information (NCBI; www.ncbi.nlm.nih.gov).
24
25 226 Functional classification analyses were performed according the Gene Ontology (www.geneontology.org/)
26
27 227 and the Arabidopsis TIGR *Arabidopsis thaliana* (www.tigr.org/) databases. Putative protein domains were
28
29 228 identified using the ProtParam of the ExPASy proteomics server at the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB;
30
31 229 www.isb-sib.ch) and the InterProScan at the European Bioinformatics Institute (EBI; www.ebi.ac.uk)
32
33 230 databases. The putative nuclear localization signal (NLS) was predicted with the PredictNLS server at the
34
35 231 CUBIC (Columbia University Bioinformatics Center). Comparisons and protein sequence alignments were
36
37 232 carried out using the CLUSTAL W and the T-Coffee programs at the EBI database. Pairwise alignments were
38
39 233 conducted in order to establish protein sequence identities among species using the NeedlemanWunsch
40
41 234 (global) and SmitheWaterman (local) alignment programs at the EBI database. Phylogenetic trees were
42
43 235 created using the applications of the PHYLIP (Phylogeny Inference Package) 3.67 package (Felsenstein,
44
45 236 1989).
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 237
4 238 **RESULTS**

5
6 239 **Identification and functional annotation of expressed gene transcripts in *Opuntia streptacantha***

7
8 240 In order to identify genes involved in stress responsiveness in *O. streptacantha*, a full length, directionally
9
10 241 cloned cDNA library of one year-old cactus pear plants treated with several abiotic stresses (drought, salt,
11
12 242 cold and heat), and ABA applications (see Materials and Methods) was constructed. The cDNAs were ligated
13
14 243 into pDNR-LIB vector and transformed into Top10 *Escherichia coli* cells. Subsequently, 800 colonies of the
15
16 244 cDNA library were picked at random from the plates, and their plasmid DNA was isolated. We selected 442
17
18 245 plasmids having inserts greater than 500 bp, with an average size of 700 bp (data not shown). After data
19
20 246 assembly with the Seqman program (DNASTAR, Madison, WI) and BLAST analysis (NCBI database), 329
21
22 247 unigenes consisting of 65 contigs and 264 singletons were identified (Supplemental Table I). The putative
23
24 248 function of these ESTs was assigned based on the different categories included in the Gene Ontology database
25
26 249 and considering a maximum probability threshold per sequence to an *E*-value of 10^{-4} . Accordingly, all the
27
28 250 ESTs were classified into eleven functional categories including: stress responsiveness (9%), metabolism
29
30 251 (6%), cellular transport and ion homeostasis (7%), photosynthesis (6%), protein synthesis (5%), signaling
31
32 252 (4%), folding, degradation and protein modification (3%), development, division and cellular organization
33
34 253 (3%), transcription (2%), unknown function (13%) and no hit (42%) as shown in Figure 1. Among the
35
36 254 proteins of known function, the ones corresponding to stress responsiveness were the most represented, as
37
38 255 expected by the multiple stress conditions applied to the cactus pear plants. In addition, a large number of
39
40 256 ESTs had no hit with the NCBI database suggesting that several sequences might encode novel proteins or are
41
42 257 incomplete cDNA sequences including mostly the putative 3'-UTR. All the nucleotide sequences of the *O.*
43
44 258 *streptacantha* cDNA library were deposited at the NCBI GenBank database under the accession numbers
45
46 259 HO058618 - HO058946.

47 260

48
49 261 **The *OpsDHNI* gene of *Opuntia streptacantha* encodes a SK₃-acidic dehydrin**

50
51 262 The most abundant EST (unigene 33) was selected for its further characterization under abiotic stress. This
52
53 263 unigene encodes a dehydrin protein and was named *OpsDHNI* (Supplemental Table I). The *OpsDHNI* full
54
55 264 length cDNA sequence (accession no. HO058650) of 905 bp, includes 76 bp of 5'-UTR and 82 bp of 3'-UTR.
56
57 265 The open reading frame consists of 747 bp encoding a polypeptide of 248 amino acids with a predicted
58
59
60

1
2
3 266 molecular mass of 28.36 kDa and an isoelectric point (pI) of 5.43. The deduced amino acid sequence of the
4
5 267 cactus pear OpsDHN1 protein revealed characteristic features of other plant dehydrins (DHNs), such as a high
6
7 268 hydrophilicity, as deduced by the content of charged and polar amino acids including glutamic acid (18.1%)
8
9 269 and lysine (16.9%) (Close 1997). In addition, a high content of glycine residues (5.6%), a lack of tryptophan
10
11 270 and low proportion of cysteine residues (one residue). Furthermore, the OpsDHN1 protein contains a serine
12
13 271 repeat segment (S) located at residues 75-79 and, three conserved lysine-rich regions (K) at the central
14
15 272 (residues 98-112 and 172-186) and C-terminal region (residues 212-226), encoding a SK₃-type acidic DHN
16
17 273 protein (Fig. 2). A nuclear localization signal (NLS, KRRKKEKKE) is localized between the conserved S-
18
19 274 segment and the first K-segment motif (Fig. 2, underlined). A histidine-rich motif (KQKDHSHHHHDEED)
20
21 275 characteristic of metal binding proteins was identified between the first and second K-segment (Fig. 2, double
22
23 276 underlined).

24
25 277 Comparative analysis of the OpsDHN1 protein with DHNs of other plant species showed low sequence
26
27 278 identity, conserving mainly the S-and K-motifs (Supplemental Table II). The OpsDHN1 is more closely
28
29 279 related to the *Phaseolus vulgaris* PvDHN (49%) and *Coffea canephora* CcDH3 (48%) proteins. Although the
30
31 280 identities are low (49-30%), it is observed that the OpsDHN1 are related to the SK₃ and SK₂-type dehydrins
32
33 281 (Supplemental Table II).

34
35 282 A phylogenetic tree including the OpsDHN1 protein and the ten DHN proteins identified in the *A. thaliana*
36
37 283 genome was created by Neighbor joining using the Phylogeny Inference Package (PHYLIP 3.67; Felsenstein
38
39 284 1989; Hundertmark and Hinch 2008; Bies-Etheve et al. 2008). As inferred from the tree, the OpsDHN1 is
40
41 285 clustered with the *A. thaliana* SK₃ and SK₂-type acidic DHNs, ERD10, COR47 and ERD14, which are related
42
43 286 to cold stress tolerance (Fig. 3A). The schematic representation of the characteristic protein motifs present in
44
45 287 the OpsDHN1 and the *A. thaliana* DHNs is shown in Fig. 3B. In addition, the insertion site of the unique
46
47 288 intron contained in the Arabidopsis DHNs is also represented, and interestingly, it is usually inserted within
48
49 289 the sequence that encodes the conserved S-segment and only in one case (At1g54410/KS) within the 3'-UTR
50
51 290 region (Fig. 3B, triangle, Table II). However, the intron insertion in this KS dehydrin is localized 4 bp
52
53 291 downstream (including the stop codon and one base pair of the 3'-UTR) of the sequence encoding the S-
54
55 292 segment within the C-termini. In addition, these introns are phase 0 (inserted between two codons) and are
56
57 293 characterized by GT-AG borders. In order to determine if the *OpsDHN1* gene also contains an intron, specific

1
2
3 294 oligonucleotides were designed on the basis of the full length cDNA sequence and a genomic fragment of
4
5 295 1139 bp in length was cloned and sequenced (Table I, Supplemental Fig. 1). This genomic fragment includes
6
7 296 part of the 5' and 3'-UTR regions as well as the entire coding region, which was interrupted by an intron of
8
9 297 234 bp (Figs. 3B, Supplemental Fig. 1). As described for the *A. thaliana* proteins, the intron of the *OpsDHNI*
10
11 298 gene is inserted within the sequence that encodes the S-segment. Furthermore, we analyzed the presence of
12
13 299 introns in other *DHNs* from mono- and dicotyledonous plants (Supplemental Table III), and observed a similar
14
15 300 intron insertion pattern (one intron) only in *DHNs* containing the S-segment; whereas other type of *DHNs*
16
17 301 without S-segment might contain up to three introns, such as the *Physcomitrella patens* Y₁₁K (Saavedra et al.
18
19 302 2006). The insertion site of these *P. patens* introns is not related to the sequences encoding the Y- or the K-
20
21 303 segments. Further evidence on intron insertion sites associated to the sequence encoding the S-segment is
22
23 304 presented based on *in silico* analysis between dehydrin orthologs of *A. thaliana* and *A. lyrata* (Table II). These
24
25 305 ortholog proteins share high percentage of sequence identities *ca.* 80-90% (Table II). Interestingly, the introns
26
27 306 of *A. lyrata* dehydrins follow a similar pattern of insertion as their counterparts in *A. thaliana*, excepting the
28
29 307 K6-type dehydrin that contains a very large intron (4310 bp) in *A. lyrata* which is absent in the *A. thaliana*
30
31 308 ortholog.

310 **The *OpsDHNI* gene is up-regulated under abiotic stresses**

311 The expression of the *OpsDHNI* gene was analyzed by qRT-PCR in twelve-month-old *O. streptacantha*
312 young plants subjected to six stress treatments: salinity (N), heat-salinity (HN), cold (C), heat-cold (HC),
313 drought-heat (DH) and drought-heat-cold (DHC) for seventeen days (Fig. 4). In addition, control treatments
314 (semi-hydroponic and commercial soil mixture) were included. Depending on the stress treatments, plants
315 were grown in a commercial soil mixture or under semi-hydroponic conditions (see Materials and Methods).
316 Most of the stress treatments induced a decrease in succulence, which resulted in flaccid cladodes
317 (Supplemental Fig. 2).

318 High expression levels (*ca.* 130-fold) were obtained under cold stress (C), in which cactus pear plants were
319 subjected to 4°C with irrigation (Fig. 4). Interestingly, when plants were subjected to a combination of heat
320 and cold stress [40°C (day)/4°C (night)] with irrigation, a lower accumulation (*ca.* 14-fold) of the *OpsDHNI*
321 transcript was observed (Fig. 4, HC). When the same treatment was applied without irrigation (DHC), the

1
2
3 322 *OpsDHNI* gene was down-regulated. In accordance, heat stress (40°C) treatments without irrigation (HD)
4
5 323 also produced *OpsDHNI* down-regulation (Fig. 4). This data suggests that the *OpsDHNI* gene is not induced
6
7 324 in cladodes in response to heat and drought stresses. On the other hand, under semi-hydroponic conditions,
8
9 325 salt stress treatments (250 mM NaCl) induced a *ca.* 16-fold transcript accumulation (Fig. 4, N). The
10
11 326 combination of salt stress with heat stress (40°C, HN) induced lower levels of transcript accumulation in
12
13 327 comparison to salt stress (N) treatments (Fig. 4).
14
15 328

17 329 **The *OpsDHNI* gene is induced at the transcriptional level by ABA**

18
19 330 The effect of ABA on the expression of *OpsDHNI* gene in twelve-week-old *O. streptacantha* young plants
20
21 331 was analyzed by qRT-PCR using different ABA concentrations and short periods of time (Fig. 5). As
22
23 332 observed in the figure, the *OpsDHNI* gene expression decreased gradually with time and in an ABA dose-
24
25 333 dependent manner. The highest expression level was observed at 1.5 h of treatment with 0.1 µM ABA (*ca.* 15-
26
27 334 fold, Fig. 5).
28
29 335

31 336 **The overexpression of the *OpsDHNI* gene allows *A. thaliana* transgenic plants recover from freezing** 32 33 337 **stress**

34
35 338 The possible role of the *OpsDHNI* gene under stress conditions was assessed by the generation of over-
36
37 339 expressing lines of *A. thaliana* (*35S::OpsDHNI-1* to *-3*; Fig. 6). The expression of the *OpsDHNI* gene in
38
39 340 Arabidopsis was determined by semi-quantitative RT-PCR, observing that all transgenic lines showed
40
41 341 expression of the cactus pear gene in different degrees, in comparison to control plants (Col-0) in which no
42
43 342 expression was detected (Fig. 6B). The over-expressing lines *35S::OpsDHNI-1*, *35S::OpsDHNI-2* and
44
45 343 *35S::OpsDHNI-3* were subjected to freezing stress for 2 h at -15°C after a period of cold acclimation (see
46
47 344 Materials and Methods). After stress treatments, plants were allowed to recover for 21 d and the percentage of
48
49 345 survival was recorded (Fig. 6C-D). In general, over-expressing lines presented 2.5 to 3-fold higher survival
50
51 346 rates than control plants (Fig. 6D). In addition, the effect of NaCl treatment was assessed using the
52
53 347 *35S::OpsDHNI-1* Arabidopsis transgenic line (Supplemental Fig. 3), showing no differences between the
54
55 348 over-expressing line and control (Col-0) plants under salt stress (150mM NaCl). It is important to mention
56
57 349 that under normal growth conditions there are no phenotypic differences between the transgenic lines and
58
59
60

1
2
3 350 Col-0 plants (Fig. 6, Supplemental Fig. 3). Our results suggest that the *OpsDHNI* gene might have an
4
5 351 important role in the stress recovery mechanisms to freezing stress condition.
6
7 352

8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review

1
2
3 353
4 354 **DISCUSSION**

5
6 355 Plants are continually subjected to different types of environmental stresses: extreme temperatures,
7
8 356 high salinity, drought and others. Nowadays, environmental stresses are increasing do to global warming,
9
10 357 pollution and soil degradation, affecting dramatically plant development and productivity. However, some
11
12 358 plants are adapted to extreme environmental conditions such as cactus pear (*Opuntia* spp.). This plant species
13
14 359 belongs to the Caryophyllales Order, and has several anatomical, morphological and physiological
15
16 360 adaptations that enable its surveillance under extreme conditions. Most of these adaptations are related to the
17
18 361 water use efficiency, such as succulent cactus pear cladodes, which store large amounts of water, the
19
20 362 replacement of leaves by thorns, thick cuticle cladode, low stomatal frequency and sunken stomata. In
21
22 363 addition, its CAM metabolism allows night-time CO₂ uptake avoiding water loss through transpiration (Black
23
24 364 and Osmond, 2003). We consider that all these adaptations make cactus pear an interesting model for the
25
26 365 understanding of the molecular events associated to abiotic stress tolerance in CAM plants. Up to now,
27
28 366 *Opuntia* species have been important for the understanding of plant ecophysiology; however, few studies at
29
30 367 the molecular level exist and less information regarding sequences have been deposited at the GenBank
31
32 368 database (Nobel 1997; Griffith 2004; Silva-Ortega et al. 2008). cDNA libraries are a fundamental tool of plant
33
34 369 molecular biology. Plant EST sequencing obtained from stress conditions have been used as an effective, fast
35
36 370 and economical method for gene isolation, the generation of molecular markers and the characterization of
37
38 371 transcriptional patterns (Ohlrogge and Benning 2000). In the present study, we were interested in the
39
40 372 identification of cactus pear ESTs related to stress response. In this sense, we subjected twelve-month-old
41
42 373 cladodes of *O. streptacantha* to several stress treatments (heat, cold, salt and drought) to construct a cDNA
43
44 374 library. Equal amounts of total RNAs obtained from each treatment were mixed and used as template for the
45
46 375 synthesis of double stranded cDNA, expecting that several stress related genes enhance their expression under
47
48 376 these conditions and, thus increasing the probability of their isolation. We obtained 329 unigenes, from which
49
50 377 9% were related to stress responsiveness. This percentage is similar to those obtained in subtractive libraries
51
52 378 under abiotic stress (Zhang et al. 2005; Sahu and Shaw 2009), in which the enrichment of ESTs of a desirable
53
54 379 condition is accomplished. In total, we found 29 unigenes encoding stress related genes such as LEA proteins
55
56 380 (late embryogenesis abundant), ERD15 (early responsive to dehydration 15), abscisic acid stress ripening
57
58 381 protein, lipid transfer protein, catalase, heat shock proteins, metallothioneins, glutathione-S-transferase,

1
2
3 382 among others (Supplemental Table I). From these set of genes, we selected the most abundant unigene which
4
5 383 encodes an acidic SK₃-type dehydrin (OpsDHN1) for its molecular and functional characterization under
6
7 384 abiotic stress. During the last two decades, special attention has been given to the role of plant dehydrin
8
9 385 proteins in developmental and stress responses, since these proteins accumulate during the maturation of
10
11 386 seeds and pollen, and in response to drought, low temperature and salinity (Close 1996; Battaglia et al. 2008).
12
13 387 It has been predicted that plant dehydrins are fully disordered proteins with only some local preferences to α -
14
15 388 helical motifs, proposing their chaperone-like activity (Tompa and Kovacs 2010). In addition, their
16
17 389 participation in membrane stabilization, water buffering, radical-scavenging, metal binding and cryoprotective
18
19 390 activities have been described (Rorat 2006; Hara et al. 2005); nevertheless, their precise function at the
20
21 391 molecular level is still unknown. Plant dehydrins belong to the group 2 of LEA proteins. LEA proteins have
22
23 392 been classified into seven families according to their hydrophilic (group 1, 2, 3, 4, 6 and 7) and hydrophobic
24
25 393 (group 5) properties (Battaglia et al. 2008). In general, hydrophilic LEAs have been named as “hydrophilins”
26
27 394 according to some physicochemical properties for instance, its high hydrophilicity index (>1), high glycine
28
29 395 content (>6%), and low proportion of cysteine and tryptophan residues (Garay-Arroyo et al. 2000; Battaglia et
30
31 396 al. 2008). In the *A. thaliana* genome, 51 genes encoding LEA proteins have been described and classified into
32
33 397 9 groups (Hundertmark and Hinch 2008). Among them, 10 genes encode dehydrins and contain the
34
35 398 conserved S-, K- and Y- motifs. Dehydrins genes have been identified in all higher plant species studied so
36
37 399 far (angiosperms and gymnosperms) as well as in early land plants like *P. patens* (Close 1997; Saavedra et al.
38
39 400 2006; Garay-Arroyo et al. 2000). In all plant species the K-motif is the main identifier of this group of
40
41 401 proteins (Battaglia et al. 2008).

42
43 402 The coding sequence of most of the plant dehydrin genes analyzed in this study is split by an intron. In
44
45 403 the case of the dehydrins of Arabidopsis species (*A. thaliana* and *A. lyrata*), the intron insertion site is
46
47 404 associated with sequences encoding serine residues, and in most of the cases this corresponds to the conserved
48
49 405 S-segment. This is also maintained for the *O. streptacantha* OpsDHN1 intron and for other introns present in
50
51 406 dehydrins from mono- and dicotyledonous plants containing the S-segment. Whereas DHNs lacking the S-
52
53 407 segment contain up to three introns. According to intron number and position, dehydrins might have two
54
55 408 evolutive origins: those having one intron associated to the S-segment, and the other ones lacking the S-
56
57 409 segment and containing one or more introns that are not related to any of the characteristic K or Y-motifs.

1
2
3 410 At the protein level, the OpsDHN1 analyzed in this study is related to the SK₂ and SK₃-type acid
4
5 411 dehydrins from *A. thaliana* showing identities of 44% (ERD14), 35% (ERD10) and 33% (COR47),
6
7 412 maintaining only stretches of high identity at the conserved S and K motifs. Acidic dehydrins such as
8
9 413 LTI29/ERD10 and COR47 have been found to be regulated under abiotic stress conditions, mainly during
10
11 414 cold stress (Nylander et al. 2001). These data are in agreement with our results, in which the *OpsDHN1*
12
13 415 transcript accumulates to a high extent in response to cold stress. Furthermore, the *OpsDHN1* gene is
14
15 416 regulated at transcriptional level by ABA in a time and concentration-dependent manner, a feature reported
16
17 417 for other plants species (Xu et al. 2008a; Lee et al. 2005; Chung et al. 2003). In the maize Rab17 dehydrin,
18
19 418 ABA transcriptional regulation is mediated by the presence of cis-acting elements in the promoter region
20
21 419 including ABA-responsive elements (ABRE) and drought responsive elements (DRE) (Busk et al. 1997). In
22
23 420 this sense, it might be suggested that the ABA signaling pathway is relevant for the induction of *DHN* genes
24
25 421 under stress.

26
27 422 On the other hand, we found out that the *OpsDHN1* gene is not induced at the transcriptional level by
28
29 423 heat and drought stresses. In accordance, we observed no induction of the *OpsDHN1* gene in cladodes during
30
31 424 long term (15, 30 and 45-d) drought stress experiments conducted in a greenhouse (unpublished
32
33 425 observations). Under our experimental conditions, the observation that the *OpsDHN1* gene is accumulated
34
35 426 under cold stress but not under dehydration conditions induced by heat and drought stresses constitutes a
36
37 427 relevant data. Rorat et al. (2006) who found that the DHN24 protein levels of *Solanum* species (SK₃-type
38
39 428 DHN) progressively decreased during dehydration conditions but not during cold stress. In these sense, these
40
41 429 SK₃-acidic proteins might play important protective roles under low temperature stress.

42
43 430 DHNs are also involved in protection against metal toxicity (Hara et al. 2005; Zhang et al. 2006; Xu et
44
45 431 al. 2008b). In the case of the KS-type DHN from citrus (CuCOR15; *Citrus unshiu* cold-regulated 15 kDa) the
46
47 432 presence of a histidine-rich motif (HKGEHHSGDHH) was associated to high affinity for Cu²⁺ binding (Hara
48
49 433 et al. 2005). Otherwise, Alsheikh et al. (2003) reported that phosphorylation of the serine-rich motif of the
50
51 434 ERD14 protein from *A. thaliana* is required for Ca²⁺ binding. The property of this protein to bind calcium
52
53 435 might be related to buffer activities modulating calcium levels or have a calcium-dependent chaperone-like
54
55 436 activity. The accumulation of some SKn-type DHNs transcripts under metal stress has been described (Zhang

1
2
3 437 et al. 2006; Xu et al. 2008b). In accordance, it would be interesting to determine if the histidine-rich motif and
4
5 438 the the S-segment present in the cactus pear OpsDHN1 protein might have a role in metal binding.
6

7 439 Functional characterization of the role of the *OpsDHN1* gene under freezing stress conditions was
8
9 440 assessed in *A. thaliana*. Under our experimental conditions, after 21 d of stress recovery, all three over-
10
11 441 expressing lines showed higher survival rates (*ca.* 3 fold higher) than Col-0 plants. Our data suggests that the
12
13 442 OpsDHN1 might have an important role in freezing stress tolerance. Cold stress tolerance has been achieved
14
15 443 by the generation of transgenic plants over-expressing the CuCOR19 from *Citrus unshiu* Marcov in tobacco
16
17 444 (Hara et al. 2003), the DHN24 from *Solanum sogarandinum* in cucumber (Yin et al. 2006) and the RcDhn5
18
19 445 from *Rhododendron catawbiense* in *A. thaliana* (Peng et al. 2008). Furthermore, the over-expression of the
20
21 446 RAB18 together with COR47, and the LTI29 together with LTI30 (TP10) conferred freezing stress tolerance
22
23 447 in *A. thaliana* (Puhakainen et al. 2004). In general, it has been suggested that radical-scavenging properties of
24
25 448 DHNs and protection against lipid peroxidation are part of the cold stress tolerance mechanism.
26

27 449 The isolation and characterization of *Opuntia* spp. genes such as the *OpsDHN1* provide important information
28
29 450 regarding the molecular mechanisms of stress tolerance in CAM plants. As well, they constitute a useful
30
31 451 platform for the generation of the first cactus pear database, complementing the biochemical and phylogenetic
32
33 452 studies that have been made in this important crop plant. In addition, this data could help in the understanding
34
35 453 of abiotic stress tolerance in arid environments, which is becoming a crucial aspect for the prediction of
36
37 454 climate impact on native desert plants.
38

39 455

40 456 **ACKNOWLEDGEMENT**

41
42 457 This work was supported by the SAGARPA (2004-C01-216) and the CONACYT (Investigación Ciencia
43
44 458 Básica 2008-103106) fundings.
45

46 459

47 460

48 461

49 462

50 463

51 464

465 **REFERENCES**

- 466 Allagulova ChR, Gimalow FR, Shakirova FM, Vakhitov VA (2003) The plant dehydrins: Structure and
467 putative functions. *Biochemistry (Mosc)* 68: 945-951
- 468 Alsheikh MK, Heyen BJ, Randall SK (2003) Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent
469 upon phosphorylation. *J Biol Chem* 278: 40882-40889
- 470 Bae EK, Lee H, Lee JS, Noh EW (2009) Differential expression of a poplar SK₂-type dehydrin gene in
471 response to various stresses. *BMB Rep* 27: 439-443
- 472 Basset CL, Wisniewski ME, Artlip TS, Richart G, Norelli JL, Farrell Jr RE (2009) Comparative expression
473 and transcript initiation of three peach dehydrin genes. *Planta* 230: 107-118
- 474 Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Covarrubias AA (2008) The enigmatic LEA
475 Proteins and Other Hydrophilins. *Plant Physiol* 148: 6-24
- 476 Black CC, Osmond CB (2003). Crassulacean acid metabolism photosynthesis: 'working the night shift'.
477 *Photosynth Res* 76: 329-341
- 478 Bies-Ethève N, Gaubier-Comella P, Debures A, Lasserre E, Jobet E, Raynal M, Cooke R, Delseny M (2008)
479 Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant)
480 protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 67: 107-124
- 481 Borovskii GB, Stupnikova IV, Antipina AI, Vladimirova SV, Voinikov VK (2002) Accumulation of
482 dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA
483 treatment. *BMC Plant Biol* 2: 1-7
- 484 Brini F, Hanin M, Lumbreras V, Amara I, Khoudi H, Hassairi A, Pagès M, Masmoudi K (2007)
485 Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in
486 *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep* 26: 2017-2026
- 487 Busk PK, Jensen AB, Pagès M (1997) Regulatory elements in vivo in the promoter of the abscisic acid
488 responsive gene *rab17* from maize. *Plant J* 11: 1285-1295
- 489 Campbell SA, Close TJ (1997) Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. *New*
490 *Phytol* 137: 61-74
- 491 Chung E, Kim SY, Yi SY, Choi D (2003) *Capsicum annuum* dehydrin, an Osmotic-Stress Gene in Hot
492 Pepper Plants. *Mol Cells* 15: 327-332

- 1
2
3 493 Close JT (1996) Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins.
4
5 494 Physiol Plantarum 97: 795-803
6
7 495 Close JT (1997) Dehydrins: A commonality in the response of plants to dehydration and low temperature.
8
9 496 Physiol Plantarum 100: 291-297
10
11 497 Cushman JC (2001) Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments.
12
13 498 Plant Physiol 127: 1439-1448
14
15 499 Dure L (1993) A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. Plant J 3: 363-369
16
17 500 Fan Z, Wang X (2006) Isolation and characterization of a novel dehydrin gene from *Capsella bursa-pastoris*.
18
19 501 Mol Biol 40: 43-50
20
21 502 Felsenstein J (1989) PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.2). Cladistics 5, 164-166.
22
23 503 Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garcarrubio A, Covarrubias AA (2000) Highly hydrophilic proteins
24
25 504 in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. J Biol Chem 275:
26
27 505 5668-5674
28
29 506 Griffith, MP (2004) The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica*: New molecular evidence.
30
31 507 Am J Bot 91: 1915-1921
32
33 508 Hara M, Terashima S, Kuboi T (2001) Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive
34
35 509 dehydrin from *Citrus unshiu*. Journal of Plant Physiology 158:1333-1339
36
37 510 Hara M, Terashima S, Fukaya T, Kuboi T (2003) Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid
38
39 511 peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. Planta 217: 290-298
40
41 512 Hara M, Fujinaga M, Kuboi T (2005) Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. J Biol
42
43 513 Chem 56: 2695-2703
44
45 514 Hara M, Shinoda Y, Tanaka Y, Kuboi T (2009) DNA binding of citrus dehydrin promoted by zinc ion. Plant
46
47 515 Cell Environ 32: 532-541
48
49 516 Heyen BJ, Alsheikh MK, Smith EA, Torvik K, Seals DF, Randall SK (2002) The calcium-binding activity of
50
51 517 a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. Plant Physiol 130: 675-
52
53 518 687
54
55 519 Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil. Calif. Agr. Expt.
56
57 520 Sts. Circ. 347
58
59
60

- 1
2
3 521 Hundertmark M, Hinch DK (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes
4
5 522 in *Arabidopsis thaliana*. BMC Genomics 9: 1-22
6
7 523 Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. Annu Rev Plant Physiol
8
9 524 Plant Mol Biol 47: 377-403
10
11 525 Kosova K, Prařil I, Vıtamvas P (2010) Role of Dehydrins in Plant Stress Response. In: Pessarakli M (ed)
12
13 526 Handbook of Plant and Crop Stress, 3rd edn. CRC Press, pp 239-285
14
15 527 Kovacs D, Kalmar E, Torok Z, Tompa P (2008) Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered
16
17 528 stress-related plant proteins. Plant Physiol 147: 381-390
18
19 529 Koag MC, Wilkens S, Fenton RD, Resnik J, Vo E, Close TJ (2009) The K-Segment of maize DHN1 mediates
20
21 530 binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. Plant Physiol 150:
22
23 531 1503-1514
24
25 532 Lee SC, Lee MY, Kim SJ, Jun SH, An G, Kim SR (2005) Characterization of an abiotic stress-inducible
26
27 533 dehydrin gene, *OsDhn1*, in rice (*Oriza sativa* L.) Mol Cells 19: 212-218
28
29 534 Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR
30
31 535 and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. Methods 25: 402-408
32
33 536 Luttge U (2004) Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). Ann Bot 93: 629-652
34
35 537 Nobel PS (1997) Recent Ecophysiological Findings for *Opuntia ficus-indica*. J PACD 2: 89-96
36
37 538 Nobel PS, Bobich EG (2002) Environmental Biology. In: Nobel PS (ed) Cacti: Biology and Uses. UC Press,
38
39 539 Berkeley, California, USA pp. 57-74
40
41 540 Nylander M, Svensson J, Palva ET, Welin BV (2001) Stress-induced accumulation and tissue-specific
42
43 541 localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. Plant Mol Biol 45: 263-279
44
45 542 Ohlrogge J, Benning C (2000) Unraveling plant metabolism by EST analysis. Curr Opin Plant Biol 3: 224-
46
47 543 228
48
49 544 Pimienta-Barrios E (1994) Prickly pear (*Opuntia* spp.): A valuable fruit crop for the semi-arid lands of
50
51 545 Mexico. J Arid Environ 28: 1-11
52
53 546 Puhakainen T, Hess MW, Makela P, Svensson J, Heino P, Palva ET (2004) Overexpression of multiple
54
55 547 dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in Arabidopsis. Plant Mol Biol 54: 743-753
56
57
58
59
60

- 1
2
3 548 Peng Y, Reyes JL, Wei H, Yang Y, Karlson D, Covarrubias AA, Krebs SL, Fessehaie A, Arora R (2008)
4
5 549 RcDhn5, a cold acclimation-responsive dehydrin from *Rhododendron catawbiense* rescues enzyme
6
7 550 activity from dehydration effects in vitro and enhances freezing tolerance in *RcDhn5*-
8
9 551 overexpressing *Arabidopsis* plants *Physiol Plant* 134: 583-597
10
11 552 Rabas AR, Martin CE (2003) Movement of water from old to young leaves in three species of succulents.
12
13 553 *Ann Bot* 92: 529-536
14
15 554 Reyes JL, Rodrigo MJ, Colmenero-Flores JM, Gil JV, Garay-Arroyo A, Campos F, Salamini F, Bartels D,
16
17 555 Covarrubias AA (2005) Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from
18
19 556 water limitation effects in vitro. *Plant Cell Environ* 28: 709-718
20
21 557 Rodríguez-Kessler M, Ruiz OA, Maiale S, Ruiz-Herrera J, Jiménez-Bremont JF (2008) Polyamine
22
23 558 metabolism in maize tumors induced by *Ustilago maydis*. *Plant Physiol Biochem* 46: 805-814
24
25 559 Rorat T, Szabala BM, Grygorowicz WJ, Wojtowicz B, Yin Z, Rey P (2006) Expression of SK3-type dehydrin
26
27 560 in transporting organs is associated with cold acclimation in *Solanum* species. *Planta* 224: 205–221
28
29 561 Saavedra L, Svensson J, Carballo V, Izemendi D, Welin B, Vidal SA (2006) A dehydrin gene in
30
31 562 *Physcomistrella patens* is required for salt and osmotic stress tolerance. *Plant J* 45: 237-249
32
33 563 Sahu BB, Shaw BP (2009) Isolation, identification and expression analysis of salt-induced genes in *Suaeda*
34
35 564 *maritima*, a natural halophyte, using PCR-based suppression subtractive hybridization. *BMC Plant*
36
37 565 *Biol* 9: 1-25
38
39 566 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Vol. 2. Cold
40
41 567 Spring Harbor, N.Y. Cold Spring Harbor Laboratory.
42
43 568 Shakirova FM, Allagulova CR, Bezrukova AM, Aval'baev AM, Gimalov FR (2009) The role of endogenous
44
45 569 ABA in cold-induced expression of the *TADHN* dehydrin gene in wheat seedlings. *Russ J Plant*
46
47 570 *Physiol* 56: 720-723
48
49 571 Shen Y, Tang MJ, Hu YL, Lin ZP (2004) Isolation and characterization of a dehydrin-like gene from drought-
50
51 572 tolerant *Boea crassifolia*. *Plant Sci* 166: 1167-11175
52
53 573 Silva-Ortega CO, Ochoa-Alfaro AE, Reyes-Agüero JA, Aguado-Santacruz GA, Jiménez -Bremont JF (2008)
54
55 574 Salt stress increases the expression of *p5cs* gene and induces proline accumulation in cactus pear.
56
57 575 *Plant Physiol Biochem* 46: 82-97
58
59
60

- 1
2
3 576 Thomashow MF (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Ann
4
5 577 Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 50: 571-599
6
7 578 Tompa P, Kovacs D (2010) Intrinsically disordered chaperons in plants and animals. Biochem Cell Biol 88:
8
9 579 167-174
10
11 580 Tunnacliffe A, Wise MJ (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. Naturwissenschaften 94:
12
13 581 791-812
14
15 582 Wang WX, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2001) Biotechnology of plant osmotic stress tolerance:
16
17 583 physiological and molecular considerations. Acta Hort 560: 285-292
18
19 584 Wang W, Vinocur B, Altman A (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures:
20
21 585 towards genetic engineering for stress tolerance. Planta 218: 1-14
22
23 586 Weiss J, Egea-Cortines M (2009) Transcriptomic analysis of cold response in tomato fruits identifies dehydrin
24
25 587 as a marker of cold stress. J Appl Genet 50: 311-319
26
27 588 Xu J, Zhang Y, Guan Z, Wei W, Han L, Chai T (2008a). Expression and function of two dehydrins under
28
29 589 environmental stresses in *Brassica juncea* L. Mol Breeding 21: 431-438.
30
31 590 Xu J, Zhang YX, Wei W, Han L, Guan ZQ, Wang Z, Chai TY (2008b) *BjDHNs* confer heavy-metal tolerance
32
33 591 in plants. Mol Biotechnol 38, 91-98
34
35 592 Yin Z, Rorat T, Szabala BM, Ziolkowska A, Malepszy S (2006) Expression of a *Solanum soganandinum*
36
37 593 SK3-type dehydrin enhances cold tolerance in transgenic cucumber seedlings. Plant Sci 170: 1164-
38
39 594 1172
40
41 595 Zhang Y, RoufMian MA, Chekhovskiy K, So S, Kupfer D, Lai H, Roe BA (2005). Differential gene
42
43 596 expression in *Festuca* under heat stress conditions. J Expe Bot 56: 897-907
44
45 597 Zhang Y, Li J, Yu F, Cong L, Wang L, Burkard G, Chai T (2006) Cloning and expression analysis of SKn-
46
47 598 type dehydrin gene from bean in response to heavy metals. Mol Biotechnol 32: 205-218
48
49 599
50
51 600
52
53 601
54
55 602
56
57 603
58
59
60

1
2
3 604 **LEGEND TO FIGURES**

4
5 605 **Figure 1.** Functional classification of 329 cactus pear unigenes that matched the nr database, into eleven
6
7 606 categories according the Gene Ontology program.
8

9 607

10
11 608 **Figure 2.** Multiple alignment of the deduced amino acid sequences of the *O. streptacantha* OpsDHN1 protein
12
13 609 with SK-type dehydrin proteins from *A. thaliana*. Identical residues (asterisk) in the four proteins and
14
15 610 conserved amino acid substitutions (dots) are indicated. Dashes show gaps in the amino acid sequences
16
17 611 introduced to optimize alignment. Characteristic motifs present in the DHN proteins are indicated: three K-
18
19 612 segments (shadowed) and one S-segment (boxed). A putative nuclear localization signal (underlined) and a
20
21 613 putative metal binding site rich in histidine residues (double-underlined) identified in the OpsDHN1 protein
22
23 614 are indicated.
24

25 615

26
27 616 **Figure 3.** Unrooted phylogenetic tree of 11 plant dehydrin proteins including the *O. streptacantha* OpsDHN1
28
29 617 (GenBank accession no. HO058650) protein and the 10 dehydrin proteins from Arabidopsis. The
30
31 618 phylogenetic tree (A) was created by Neighbor-Joining method, PHYLIP 3.67 package (Felsenstein 1989).
32
33 619 Bootstrap support values out of 1000 pseudoreplicates of the data set are provided as percentages at the
34
35 620 corresponding nodes when >50%. Schematic representation (B) of characteristic protein motifs present in
36
37 621 LEA-type 2 dehydrin proteins: lysine-rich repeat K-segment (KIKEKLPG, gray boxes); Y-segment
38
39 622 (DEYGNP, grid boxes); S-segment (tract of serine residues, black boxes). The insertion site of the intron is
40
41 623 indicated with a triangle. In the case of the At1g54410 (KS), the 3'-UTR region is represented with a
42
43 624 continuous line.
44

45 625

46
47 626 **Figure 4.** Effect of abiotic stresses on the expression of the *OpsDHN1* gene. Total RNA was isolated from
48
49 627 twelve-month-old *O. streptacantha* cladodes subjected to diverse abiotic stress treatments during 17 d. Six
50
51 628 stress treatments were applied: salinity (N), heat-salinity (HN), cold (C), heat-cold (HC), heat-drought (HD)
52
53 629 and drought-heat-cold (DHC), as described in the materials and methods section. Real-time one-step RT-PCR
54
55 630 amplification was carried out as recommended by the iScript™ One- Step RT-PCR kit with SYBR® Green.
56
57 631 Analyses were performed by triplicate. Quantification of the *OpsDHN1* gene, expressed as normalized fold
58
59
60

1
2
3 632 expression, compared mRNA levels (stress conditions) with un-treated controls and, was calculated after
4
5 633 normalization to the *O. streptacantha* elongation factor gene (*OpsEF1*; accession no. HM581972) using the
6
7 634 comparative threshold cycle method (Livak and Schmittgen 2001). In case of ratios lower than 1 (i.e. genes
8
9 635 repressed in stress conditions), the inverse of the ratio was estimated and the sign was changed, as graphically
10
11 636 represented.

12
13 637

14
15 638 **Figure 5.** Effect of ABA on the expression of the *OpsDHNI* gene. Total RNA was isolated from three-month-
16
17 639 old *O. streptacantha* cladodes subjected to 0 (control), 0.1 and 100 μ M ABA during 1.5, 6 and 12 h. Each
18
19 640 RNA sample (50 ng) was used for qRT-PCR analyses. Quantification of the *OpsDHNI* gene, expressed as
20
21 641 normalized fold expression, compared mRNA levels (ABA treatments) with un-treated controls and, was
22
23 642 calculated after normalization to the *O. streptacantha* elongation factor gene (*OpsEF1*; accession no.
24
25 643 HM581972) using the comparative threshold cycle method (Livak and Schmittgen 2001). In case of ratios
26
27 644 lower than 1 (i.e. genes repressed with ABA treatment), the inverse of the ratio was estimated and the sign
28
29 645 was changed, as graphically represented.

30
31 646 .

32
33 647 **Figure 6.** A) Schematic diagram of the *35S::OpsDHN* construct in pMDC32 binary vector. RB, right border
34
35 648 for T-DNA integration; 2X35S, cauliflower mosaic virus 35S promoter; *attB1* and *attB2* sites for
36
37 649 recombination; *OpsDHNI*, *Opuntia streptacantha DHNI* cDNA; NosT, nopaline synthase (nos) terminator
38
39 650 region; HPTII, hygromycin resistance gene; LB, left border for T-DNA integration. B) Detection of
40
41 651 *OpsDHNI* transcript in *A. thaliana* transgenic lines (*35S::OpsDHNI-1*, -2 and -3) by semi-quantitative RT-
42
43 652 PCR. Total RNA was isolated from leaves of one month old *A. thaliana* plants. One μ g of total RNA was
44
45 653 used for RT-PCR analysis. Ten microliters of the RT-PCR product were loaded on each lane and separated by
46
47 654 electrophoresis on 0.8% (w/v) agarose gel. As loading control the *OpsEF1* product was used. C) Phenotype of
48
49 655 the *35S::OpsDHNI-2*, transgenic line and the wild type (Col-0) after 21 d of recovery from freezing stress. D)
50
51 656 Survival rate of the *35S::OpsDHNI-1*, -2 and -3 transgenic lines and Col-0 plants after 21 d of freezing stress
52
53 657 recovery. Data are mean \pm SE (n=10) from 5 replicates. The experiment was conducted threefold obtaining
54
55 658 similar results.

56
57 659

1
2
3 660 **Supplemental Figure 1.** Pairwise alignment of a genomic and the cDNA sequences containing the *OspDHNI*
4
5 661 gene. The start and stop codons are shadowed. The intron borders GT/AG are bold indicated. Prediction of the
6
7 662 branch point region (CURAY, underlined) located close to the intron acceptor site AG, was performed using
8
9 663 the NetPlantGene Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPGene/>).

10
11 664
12
13 665 **Supplemental Figure 2.** Twelve-month old cactus pear plants were grown either in semi-hydroponic
14
15 666 conditions or in a commercial soil mixture, and subjected to different abiotic stresses during 17 d: control (C),
16
17 667 salinity (N), heat-salinity (HN) (semi-hydroponic); control (C), cold (C), heat-cold (HC), heat-drought (HD)
18
19 668 and drought-heat-cold (DHC) (soil mixture).

20
21 669
22
23 670 **Supplemental Figure 3.** A) Phenotype of the *35S::OspDHNI-1* transgenic line and the wild type (Col-0)
24
25 671 after 21 d of recovery from salt stress treatment (150 mM NaCl). B) Survival rate of the *35S::OspDHNI-1*
26
27 672 transgenic line and Col-0 plants after 21 d of NaCl stress recovery. Data are mean \pm SE (n=10) from 5
28
29 673 replicates. The experiments were conducted twice obtaining similar results.

30
31 674

32
33 675

34
35 676

36
37 677

38
39 678

40
41 679

42
43 680

44
45 681

46
47 682

48
49 683

50
51 684

52
53 685

54
55 686

56
57 687

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

688
689

For Peer Review

Table I. Oligonucleotides designed for the amplification of the *OpsDHN1* gene from cDNA and genomic DNA templates.

Application	Gene	Oligonucleotide sequence	Amplicon size
qRT-PCR	<i>OpsDHN1</i>	5OpsDHN1 5'-GATCGCGGACTGTTCGACTT-3' 3OpsDHN1 5'-GTCGGAACGATGGAGCTTGT-3'	171 bp
	<i>OpsEF1</i>	5-OpsEF1 5'-GGTCATTGGTCATGTCGACTCTGG-3' 3-OpsEF1 5'-GCACCCAGGCATACCTTGAATGACC-3'	150 bp
Amplification of a genomic DNA fragment	<i>OpsDHN1</i>	5gOpsDHN1 5'-GGGACAGCAAAGCAAAGCA-3' 3gOpsDHN1 5'-TCGAAAAGCATAAATCATCAAAGTTCC-3'	1139 bp
Amplification of a cDNA fragment (ORF plus 3'-UTR)		5OpsDHNORF 5'-CCAATTTCTGAAATGGCGGAAG-3' 3OpsDHNUTR 5'-GCATAAATCATCAAAGTTCCTGAC-3'	835 bp

Table II. Comparison of intron size and identity between the *Arabidopsis thaliana* y *A. lyrata* DHNs

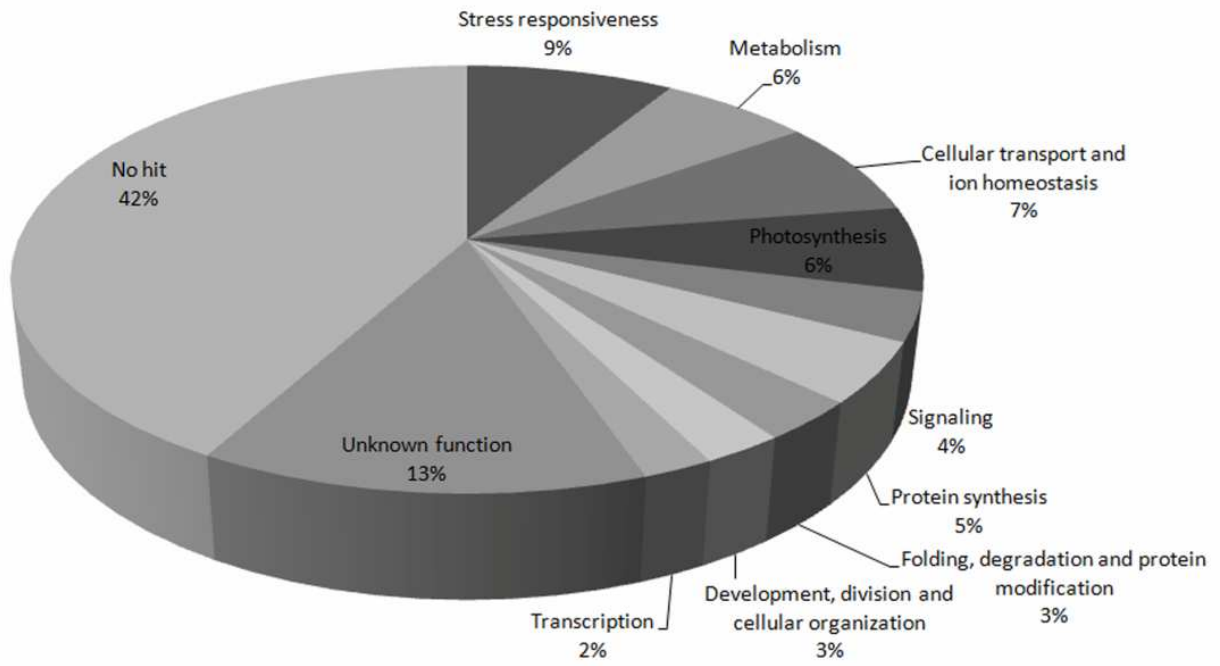
orthologs. The intron insertion site within the nucleotides encoding the S-segment is presented.

<i>A. thaliana</i>				<i>A. lyrata</i>				
Protein size (bp)	Intron size (bp)	Sequence motif *	Accession No. Name DHN-Type	Sequence motif *	Intron size (bp)	Protein size (bp)	Protein ID. **	(%) Identity global/local
186	81	SSSSS^ED	At5g66400 (RAB18) Y2SK2/ Y3SK2	SSSSS^ED	90	170	496967	75.6 75.6
185	274	SSSSSS^ED	At2g21490 Y2SK2/ Y3SK	SSSSSS^ ED	581	187	867902	83.1 83.1
128	301	SSSSSS^ED	At3g50980 (Xero1/ LT145) YSK2	SSSSSS^ED	375	127	906445	95.3 95.3
151	206	SS^YT	At4g39130 Y3K	TNL^PEE	219	161	327864	80.7 81.8
185	86	SSSS^SS	At1g76180 (ERD14) SK2	SSSS^SS	89	170	895496	83.6 83.6
163	88	SS^SS	At4g38410 SK2	SS^SS	90	164	490603	89 89
265	144	SSSS^SS	At1g20440 (COR47) SK3	SNSSASS^SS	139	264	889495	92.8 92.8
260	89	SSSS^SS	At1g20450 (ERD10) SK3	SSSSV^ K	94	252	472273	80.9 80.3
98	265	SSSDSDSD.g^	At1g54410 KS ***	SSSDSDSD.ggt^	295	98	474716 ***	99 99
193	-----	-----	At3g50970 (Xero2/Lt130) K6	HG^YG	4310	193	866487	84.1 84.1

* Intron insertion site is represented by (^)

** Accession number obtained from the Phytozome database (www.phytozome.net)

*** The intron is inserted within the 3'-UTR region. The stop codon is represented by (.), and the nucleotides after the stop codon are underlined.



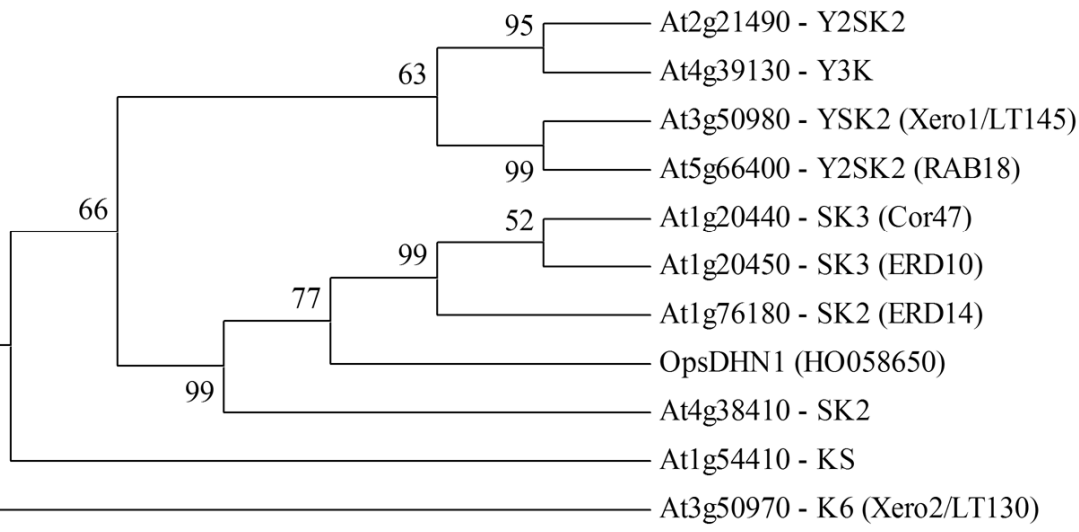
Peer Review

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

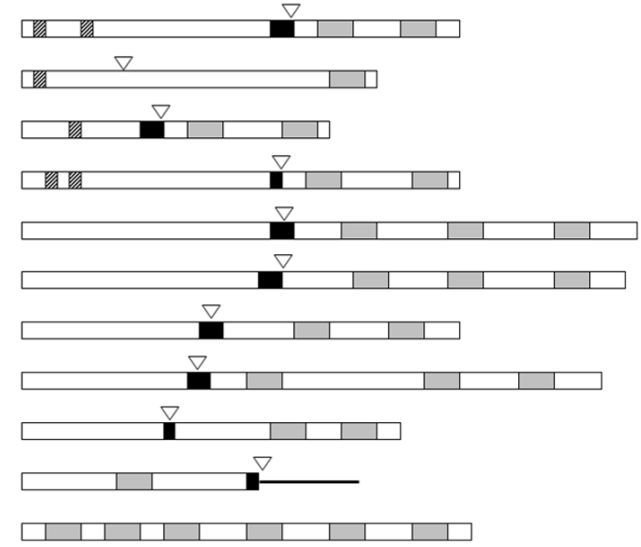
Figure 2.

1
 2
 3
 4
 5 AtCOR47 MAEEYKNNVKEHETPTVATEESPAATTEVTDRGLDFDLGKKEE--EVKPQETTTLESEFD
 6 AtERD10 MAEEYKNTVPEQETPKVATEESSA--PEIKERGMDFDL-KKKE--EVKPQETTTLASEFE
 7 AtERD14 MAEEIKN-VPEQEVPKVATEESSA---EVTDRGLDFDLGKKKD--ETKPEE-TPIASEFE
 8 OpsDhn1 MAEEH-----QKGDNVNVESSDRGLDFDMKKNKESGDEKDKQEEVIATEFH
 9 ***** ::. * .:***:***: *::: : * :: : :**.
 10
 11 AtCOR47 HKAQISEPELAA-EHEEVKENKITLLEELQEKTEEDEENKPSVIEKLHRSNSSSSSSSDE
 12 AtERD10 HKTQISEPESFVAKHE-EEEHKPTLLEQLHQHEEEENKPSLLDKLHRSNSSSSSSSDE
 13 AtERD14 QKVHISEPEPEV-KHE-----SLLEKLHRSDSSSSSSSEE
 14 OpsDhn1 HKVEVSKED----KHD-----ENKEGGLLHKLHRSDASSSSSDEE
 15 :*...*: : :*: .:..*****:*****:*
 16
 17 AtCOR47 EGEEKKEKKEK---IVEG-----EEDKKGLVEKIKEKLPGHHDKTAEDD-----
 18 AtERD10 EGEDGKKEKKEKKEKKEKIVEGDHVKTVEEENQGVMDRIKEKFP-LGKPKGGD-----
 19 AtERD14 EGSDEKRRKKEKKEK-----
 20 OpsDhn1 EGDDDEDKRRKKEK-----EKKGLKEKIKEKLPG-HHKEQEEEQEDKQKDDH
 21 **.: .:****:
 22
 23 AtCOR47 -----VPVSTTIPVPVSESVVEHDHPEEKKGLVEKIKEKLPGH
 24 AtERD10 -----VPVVTMPAP--HSVEDHKPEEKKGFMDKIKEKLPGH
 25 AtERD14 -----KPTTEVEVKEEKKGFMEKLEKLPGH
 26 OpsDhn1 HHHHDEEDTNIAIEKIHVEEVIYSEPSYPAP--APPPHLEAEGEKKGLLEKIKDKLPGQ
 27 . * *****:***:***:***:***:
 28
 29 AtCOR47 HDEKAEDSPA V T S T P L V V T E H V E P T T E L P V E H P E E K K G I L E K I K E K L P G Y H A K T T E E E V K
 30 AtERD10 S-KKPEDSQVNTPLV--ETATPIADI----PEEKKGFMDKIKEKLPGYHAKTTGEEEEK
 31 AtERD14 --KKPEDGSAVAAAPVVVPPPVEEA-----HPVEKKGILEKIKEKLPGYHPKTTVEEEK
 32 OpsDhn1 H-KKAEAEHEVVPTA-----TATVAEG----EAQEKKGFLDKIKEKIPGFHFHFKAP-EEDK
 33 :*. * * .: . . . *****:***:***:***:***: * * . * * *
 34
 35 AtCOR47 KEKESDD-----
 36 AtERD10 KEKVSD-----
 37 AtERD14 KDKE-----
 38 OpsDhn1 KDVECDQPPSST
 39 *:
 40
 41
 42
 43
 44
 45
 46
 47
 48
 49
 50
 51
 52
 53
 54
 55
 56
 57
 58
 59
 60

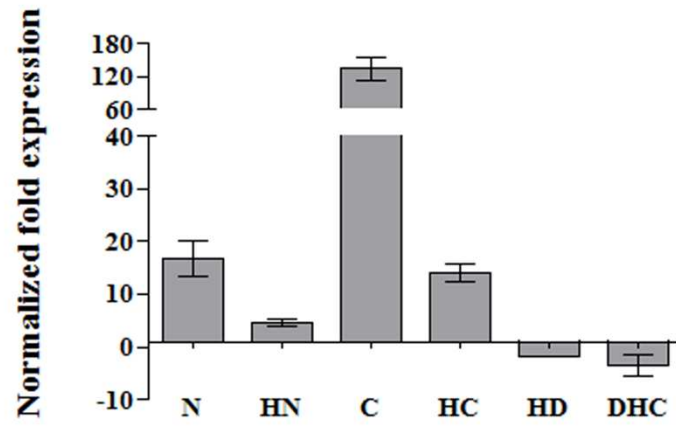
A



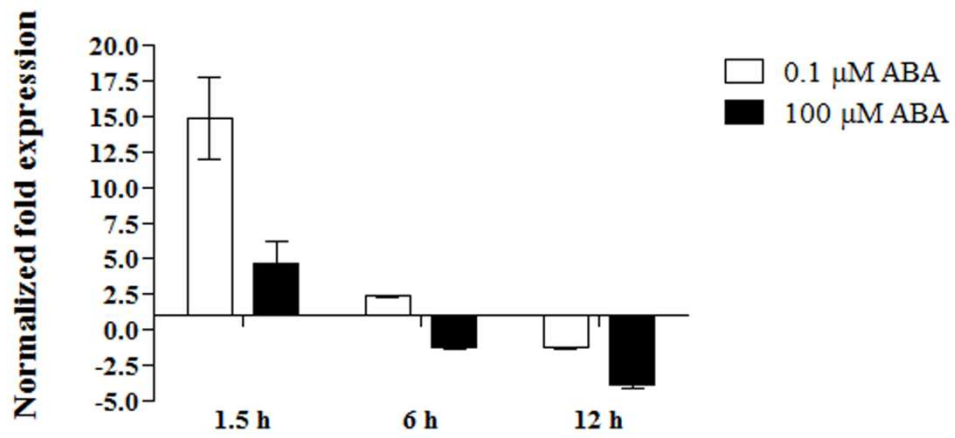
B



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

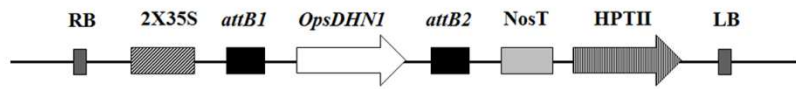


Peer Review

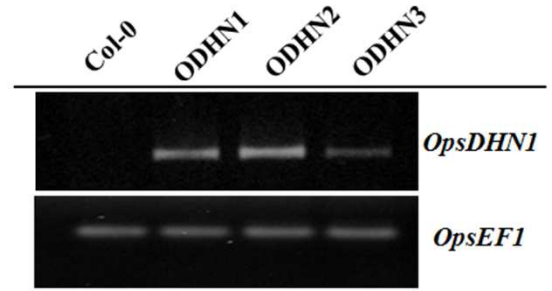


Peer Review

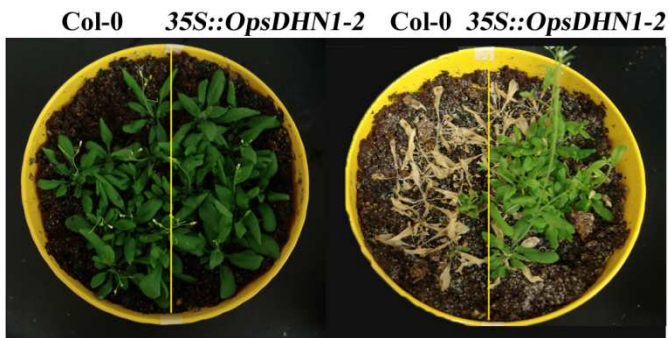
A



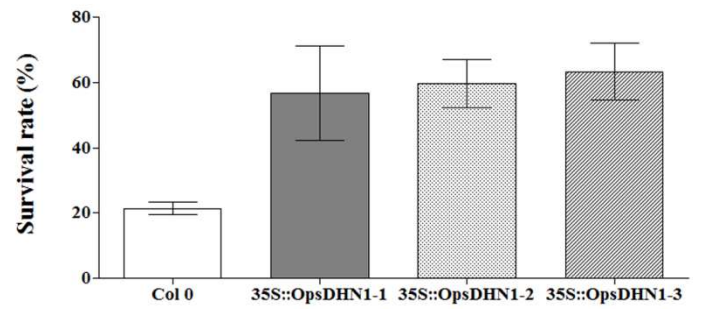
B



C



D



er Review

Supplemental Table I. Functional classification of 329 *Opuntia streptacantha* unigenes according the Gene Ontology database.

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
A) Stress responsiveness						
HO058636	19	XP_002272995	1	2OG-Fe(II) oxygenase putative	<i>Vitis vinifera</i>	1e-49
HO058650	33	CAH59415	9	dehydrin 1	<i>Plantago major</i>	8e-12
HO058667	50	ACI15208	4	abscisic acid stress ripening protein	<i>Salicornia brachiata</i>	1e-15
HO058682	65	AAY34915	3	Catalase	<i>Prunus armeniaca</i>	3e-17
HO058686	69	XP_002276082	3	DnaJ-class molecular chaperone	<i>V. vinifera</i>	9e-16
HO058703	86	BAI94496	1	lipid transfer protein	<i>Dianthus caryophyllus</i>	4e-35
HO058708	91	AF078912	6	metallothionein	<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>	6e-39
HO058719	102	CAQ64471	2	cytosolic class I small heat shock protein type 1	<i>Rhododendron rubropilosum</i>	2e-44
HO058737	120	XP_002451175	1	Ribosome associated membrane protein RAMP4	<i>Sorghum bicolor</i>	6e-28
HO058755	138	CAC83045	1	putative phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase	<i>M. crystallinum</i>	2e-38
HO058759	142	P81493	2	Defensin-like protein AX1	<i>Beta vulgaris</i>	1e-11
HO058768	151	NP_171656	1	heavy-metal-associated domain-containing protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>	3e-29
HO058770	153	AAR83864	1	28 kDa small subunit ribosomal protein	<i>Capsicum annuum</i>	3e-8

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
A) Stress responsiveness						
HO058773	156	ABG54481	2	late embryogenesis abundant protein	<i>Tamarix androssowii</i>	6e-08
HO058776	159	AAL85887	1	70 kDa heat shock protein	<i>Sandersonia aurantiaca</i>	2e-14
HO058792	175	ACV52592	1	thioredoxin H-type 1	<i>Nicotiana benthamiana</i>	2e-40
HO058857	240	AAW47577	1	metallothionein	<i>Gossypium hirsutum</i>	4e-09
HO058861	244	ABB89735	1	ERD15	<i>C. annuum</i>	8e-21
HO058864	247	XP_002509785	1	glutathione-s- transferase theta, gst, putative	<i>R. communis</i>	5e-27
HO058888	271	ACX37092	1	cyclophilin	<i>C. sinensis</i>	2e-79
HO058893	276	ABB89210	1	dehydroascorbate reductase	<i>Sesamum indicum</i>	5e-13
HO058903	286	AAK01359	1	dehydration stress- induced protein	<i>Brassica napus</i>	1e-09
HO058904	287	ACU20676	1	Heat shock factor binding protein 1	<i>Glycine max</i>	2e-21
HO058911	294	NP_054988	1	NADH dehydrogenase subunit 4	<i>S. oleracea</i>	6e-79
HO058920	303	ABL67658	1	putative multiple stress-responsive zinc- finger protein	<i>Citrus cv. Shiranuhi</i>	4e-37
HO058929	312	BAC22953	1	ascorbate peroxidase	<i>Solanum tuberosum</i>	9e-31
HO058935	318	AAQ08597	1	heat shock protein	<i>Hevea brasiliensis</i>	6e-56
HO058939	322	ABU49591	2	CDC5-like protein	<i>Solanum lycopersicum</i>	7e-44
HO058941	324	AAL32037	1	ethylene-responsive transcriptional coactivator-like protein	<i>Retama raetam</i>	9e-34

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
B) Metabolism						
HO058621	4	AAD01804	1	lipase	<i>D. caryophyllus</i>	3e-09
HO058633	16	AAL47552	1	IAA-amino acid conjugate hydrolase- like protein	<i>A. thaliana</i>	4e-3
HO058670	53	CAI39245	1	beta-amylase	<i>G. max</i>	2e-4
HO058700	83	XP_002305564	1	Glyoxalase/Bleomycin resistance protein/Dioxygenase superfamily	<i>Populus trichocarpa</i>	2e-22
HO058705	88	AAY85174	1	alpha-amylase 2	<i>Manihot esculenta</i>	6e-19
HO058718	101	P34922	1	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase, cytosolic	<i>Pisum sativum</i>	2e-45
HO058754	137	CAI39244	1	beta-amylase	<i>G. max</i>	5e-18
HO058820	203	AAM62446	3	sorbitol dehydrogenase-like protein	<i>A. thaliana</i>	2e-51
HO058830	213	XP_002323914	1	acyl-CoA thioesterase	<i>P. trichocarpa.</i>	3e-18
HO058837	220	XP_002330135	2	Glycosyltransferase	<i>P. trichocarpa</i>	1e-38
HO058853	236	CAB09796	1	L-galactono-1,4- lactone dehydrogenase	<i>Brassica oleracea</i> <i>var.</i> <i>Botrytis</i>	3e-75
HO058876	259	XP_002512239	1	Zeta-carotene desaturase, chloroplast precursor, putative	<i>R. communis</i>	6e-67
HO058885	268	XP_002518667	1	Triacylglycerol lipase 1 precursor, putative	<i>R. communis</i>	2e-73

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
B) Metabolism						
HO058902	285	XP_002511024	1	methionine sulfoxide reductase, putative	<i>R. communis</i>	4e-15
HO058907	290	XP_002530475	1	aldose-1-epimerase, putative	<i>R. communis</i>	4e-42
HO058912	295	AAV74407	1	chloroplast latex aldolase-like protein	<i>M. esculenta</i>	3e-109
HO058916	299	AAB61592	2	fructose-biphosphate aldolase	<i>M. crystallinum</i>	3e-93
HO058922	305	ACQ82818	2	sedoheptulose-1,7- bisphosphatase	<i>Cucumis sativus</i>	7e-75
HO058928	311	Q42676	1	Transketolase, chloroplast (TK)	<i>Craterostigma plantagineum</i>	2e-56
HO058938	321	ABE66400	1	carbonic anhydrase	<i>Striga asiatica</i>	2e-36
HO058942	325	CAA04526	1	magnesium chelatase subunit	<i>G. max</i>	9e-87
C) Cellular transport and ion homeostasis						
HO058618	1	EEF47370	1	acyl carrier protein, putative	<i>R. communis</i>	6e-45
HO058638	21	XP_002523617	1	Mitochondrial import receptor subunit TOM7-1, putative	<i>R. communis</i>	1e-10
HO058668	51	XP_002533972	1	multidrug resistance pump, putative	<i>R. communis</i>	1e-08
HO058684	67	CAD23987	1	ATP synthase epsilon subunit	<i>Phyllonoma ruscifolia</i>	7e-34
HO058697	80	XP_002522842	1	GDP-mannose transporter, putative	<i>R. communis</i>	4e-48

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
C) Cellular transport and ion homeostasis						
HO058740	123	XP_002515282	1	Cytochrome c oxidase polypeptide Vc, putative	<i>R. communis</i>	7e-24
HO058747	130	XP_002529885	1	gamma-soluble nsf attachment protein, putative	<i>R. communis</i>	4e-39
HO058763	146	ABE72969	1	ATPase	<i>Camellia sinensis</i>	3e-13
HO058767	150	BAD66739	2	cytochrome oxidase subunit 2	<i>B. vulgaris subsp. vulgaris</i>	6e-17
HO058772	155	ACB42441	1	aquaporin PIP2;4	<i>Gossypium irsutum</i>	4e-15
HO058783	166	XP_002528040	1	oxidoreductase, putative	<i>R. communis</i>	8e-86
HO058815	198	GQ998295	3	ATP synthase CF0 subunit I protein	<i>Gunnera manicata</i>	5e-98
HO058836	219	ACB87734	1	aquaporin	<i>M. esculenta</i>	1e-123
HO058839	222	XP_002528193	1	ATP binding protein, putative	<i>R. communis</i>	9e-5
HO058841	224	NP_001148792	2	vesicle-associated membrane protein 725	<i>Zea mays</i>	1e-70
HO058858	241	XP_002512943	1	phosphatidylinositol transporter, putative	<i>R. communis</i>	1e-24
HO058875	258	CBI37994	1	Arginine methyltransferase- interacting protein contains RING Zn- finger	<i>V. vinifera</i>	1e-34
HO058878	261	ABU85611	1	NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit J	<i>Scaevola aemula</i>	2e-20

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
C) Cellular transport and ion homeostasis						
HO058883	266	XP_002517308	1	Dual specificity phosphatase Cdc25, putative	<i>R. communis</i>	2e-52
HO058899	282	XP_002516464	1	NADH-plastoquinone oxidoreductase, putative	<i>R. communis</i>	5e-13
HO058925	308	XP_002511549	1	Vacuolar protein sorting, putative	<i>R. communis</i>	6e-94
HO058927	310	XP_002303893	1	Mitochondrial carrier protein: ADP/ATP transporter on adenylate translocase	<i>P. trichocarpa</i>	3e-69
HO058931	314	NP_195300	1	Rho-GTPase-activating protein-related	<i>A. thaliana</i>	8e-72
HO058932	315	CAD57744	1	RAB-like small G-protein	<i>Hordeum vulgare subsp. vulgare</i>	1e-20
D) Photosynthesis						
HO058623	6	CAA32183	1	Photosystem I reaction center subunit IV, chloroplast precursor	<i>Spinacia oleracea</i>	2e-24
HO058625	8	BAF80479	1	PSI reaction center subunit II	<i>Citrus sinensis</i>	2e-47
HO058643	26	CAA45775	3	subunit XI of photosystem I reaction center	<i>S. oleracea.</i>	3e-78
HO058657	40	YP_654205	1	photosystem II M protein	<i>Oryza sativa Indica Group</i>	1e-16
HO058735	118	AAA89099	1	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	<i>Pereskia aculeata</i>	2e-10

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
D) Photosynthesis						
HO058757	140	ACF33361	1	NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit 3	<i>Gonystylus bancanus</i>	4e-42
HO058758	141	NP_001105502	1	photosystem II subunit29	<i>Z. mays</i>	8e-33
HO058775	158	AAA89099	7	ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	<i>P. aculeata</i>	9e-64
HO058787	170	XP_002514914	1	chlorophyll A/B binding protein, putative	<i>R. communis</i>	4e-27
HO058788	171	1211235D	1	Photosystem II 4 kDa reaction centre component	<i>Nicotiana tabacum</i>	1e-23
HO058800	183	ABF17940	4	putative chloroplast chlorophyll a/b-binding protein	<i>Carya cathayensis</i>	1e-134
HO058833	216	ADD31246	2	NADH-plastoquinone oxidoreductase subunit K protein	<i>Berberidopsis corallina</i>	4e-55
HO058855	238	AAF06098	1	ribulose 1,5- bisphosphate carboxylase small chain precursor	<i>M. esculenta</i>	1e-16
HO058856	239	AAA33036	1	ribulose 1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit]	<i>M. crystallinum</i>	2e-75
HO058874	257	XP_002519950	1	chlorophyll A/B binding protein, putative	<i>R. communis</i>	4e-69

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
D) Photosynthesis						
HO058892	275	NP_564946	1	STN7 (STT7 HOMOLOG STN7); kinase/ protein kinase	<i>A.thaliana</i>	2e-60
HO058896	279	CAE30280	1	chlorophyll a /b binding protein	<i>B. vulgaris</i>	2e-110
HO058905	288	AAA84014	1	ribulose-1,5- bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit]	<i>Alluandia procera</i>	3e-121
HO058913	296	P22179	1	Photosystem I reaction center subunit VI, chloroplastic	<i>S. oleracea</i>	1e-33
HO058924	307	AAU03361	1	photosystem II oxygen- evolving complex protein 3	<i>Lycopersicon esculentum</i>	7e-73
HO058930	313	ABK22378	1	ribulose-5-phosphate 3- epimerase	<i>Picea sitchensis</i>	2e-99
E) Signaling						
HO058662	45	AAR98738	1	signal peptide peptidase	<i>Galega orientalis</i>	2e-48
HO058690	73	ACB32228	3	calmodulin	<i>B. vulgaris</i>	9e-66
HO058699	82	AAQ63461	1	calmodulin 4	<i>Daucus carota</i>	2e-77
HO058712	95	XP_002323661	1	CBL-interacting protein kinase 21	<i>P. trichocarpa</i>	3e-07
HO058753	136	NP_563980	1	leucine-rich repeat family protein	<i>A. thaliana</i>	5e-07
HO058764	147	AAT08648	2	ADP-ribosylation factor	<i>Hyacinthus orientalis</i>	2e-97
HO058785	168	ACX56275	1	calmodulin	<i>Z. mays</i>	1e-14

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
E) Signaling						
HO058866	249	XP_002514928 B	1	Signal peptidase complex subunit, putative	<i>R. communis</i>	5e-29
HO058879	262	XP_002520315	1	F-box and wd40 domain protein, putative	<i>R. communis</i>	3e-49
HO058882	265	XP_002521235	1	protein kinase, putative	<i>R. communis.</i>	1e-44
HO058898	281	XP_002509446	4	Auxin-repressed 12.5 kDa protein, putative	<i>R. communis</i>	4e-27
HO058917	300	XP_002514928	1	Signal peptidase complex subunit, putative	<i>R. commuis</i>	5e-29
F) Synthesis protein						
HO058676	59	CBI29686	1	aminoacyl-tRNA synthetase	<i>V. vinifera</i>	2e-12
HO058685	68	XP_002518942	1	50S ribosomal protein L11, putative	<i>R. communis</i>	4e-42
HO058691	74	XP_002514173	1	60S ribosomal protein L31, putative	<i>R. communis</i>	2e-45
HO058711	94	BAG06474	1	ribosomal protein S19	<i>Tetrapanax papyriferus</i>	8e-32
HO058739	122	AF479093	1	26S ribosomal RNA gene	<i>Portulaca grandiflora</i>	2e-99
HO058751	134	XP_002264648	1	ribosome biogenesis regulatory protein (RRS1)	<i>V. vinifera</i>	5e-06
HO058774	157	CAI48073	2	60S ribosomal protein L37a	<i>Capsicum chinense</i>	9e-45

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
F) Synthesis protein						
HO058777	160	ADB85107	6	translation initiation factor-like protein (SUI1_eIF1)	<i>Jatropha curcas</i>	9e-48
HO058789	172	NP_084740	1	ribosomal protein S7	<i>Oenothera elata</i> <i>subsp. Hookeri</i>	4e-20
HO058791	174	ABB17003	1	60S ribosomal protein L10-like protein	<i>S. tuberosum</i>	3e-15
HO058812	195	XP_002511200	2	elongation factor 1- beta, putative	<i>R. communis</i>	7e-36
HO058816	199	XP_002519752	2	60S ribosomal protein L32, putative	<i>R. communis</i>	1e-44
HO058894	277	XP_002522558	1	50S ribosomal protein L34, chloroplast precursor, putative	<i>R. communis</i>	5e-30
HO058895	278	ABA40470	1	ribosomal protein S6- like protein	<i>S. tuberosum</i>	1e-78
HO058900	283	AAP80667	1	ribosomal Pr 117	<i>Triticum aestivum</i>	5e-27
G) Folding, degradation and modification protein						
HO058642	25	EEF39023	1	ormdl, putative	<i>R. communis</i>	3e-73
HO058656	39	ACZ69386	6	polyubiquitin UBQ14	<i>C. sativus</i>	1e-56
HO058665	48	AAU82109	2	ubiquitin-conjugating enzyme	<i>T. aestivum</i>	1e-31
HO058680	63	XP_002530306	1	ubiquitin, putative	<i>R. communis</i>	2e-27
HO058710	93	NP_001068278	1	Alpha 5 subunit of 20S proteasome	<i>O. sativa Japonica</i> <i>Group</i>	1e-50
HO058882	205	XP_002525098	1	ubiquitin-conjugating enzyme m, putative	<i>R. communis</i>	3e-86

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
G) Folding, degradation and modification protein						
HO058831	214	ABB90548	1	coated vesicle membrane protein-like	<i>T. aestivum</i>	2e-68
HO058849	232	XP_002514419	1	Chaperone protein dnaJ, putative	<i>R. communis</i>	4e-04
HO058872	255	XP_002525582	1	HSP90 co-chaperone, putative	<i>R. communis</i>	8e-25
HO058923	306	EEF48533	1	ubiquitin-protein ligase, putative	<i>R. communis</i>	1e-52
H) Development, division, cellular organization						
HO058704	87	EEF49901	1	Dormancy/auxin associated protein	<i>R. communis</i>	3e-19
HO058799	182	XP_002283194	1	Dormancy/auxin associated protein	<i>V. vinifera</i>	8e-6
HO058844	227	XP_002301387	1	predicted protein	<i>P. trichocarpa</i>	1e-5
HO058852	235	AAY31012	1	maturase K	<i>Opuntia dillenii</i>	3e-60
HO058869	252	NP_001151563	1	CBS domain containing protein	<i>Z. mays</i>	1e-91
HO058886	269	XP_002533101	1	actin depolymerizing factor, putative	<i>R. communis</i>	3e-55
HO058887	270	CAA04767	1	ripening-induced protein	<i>Fragaria vesca</i>	3e-59
HO058906	289	ABF70077	1	spliceosomal U5 snRNP-specific 15 kDa protein, putative	<i>Musa acuminata</i>	9e-47
I) Transcription						
HO058679	62	XP_002526735	1	TRANSPARENT TESTA 1 protein, putative	<i>R. communis</i>	2e-37

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
I) Transcription						
HO058732	115	XP_002529910	1	zinc finger protein, putative	<i>R. communis</i>	3e-19
HO058765	148	XP_002267800	1	DNA directed RNA polymerase, 7 kDa subunit	<i>V. vinifera</i>	1e-23
HO058793	176	XP_002517811	1	binding protein, putative	<i>R. communis</i>	6e-27
HO058811	194	EEF43655	2	Ssm4 protein, putative	<i>R. communis</i>	2e-17
HO058871	254	XP_002510592	1	ring finger protein, putative	<i>R. communis</i>	2e-41
HO058909	292	XP_002517180	1	ccaat-binding transcription factor, putative	<i>R. communis</i>	2e-61
J) Unknown function						
HO058619	2	EEF49698	1	conserved hypothetical protein	<i>R. communis</i>	1e-47
HO058624	7	XP_002337775	1	predicted protein	<i>P. trichocarpa</i>	1e-10
HO058629	12	CBI33867	2	unnamed protein product	<i>V. vinifera</i>	2e-12
HO058639	22	CAN79804	1	hypothetical protein	<i>V. vinifera</i>	4e-33
HO058648	31	XP_002277479	2	hypothetical protein	<i>V. vinifera</i>	7e-05
HO058652	35	ACG28009	1	hypothetical protein	<i>Z. mays</i>	3e-06
HO058658	41	ABK23648	1	unknown	<i>P. sitchensis</i>	5e-19
HO058660	43	XP_002488947	1	hypothetical protein	<i>S. bicolor</i>	5e-30
HO058663	46	BAD95083	1	hypothetical protein	<i>A. thaliana</i>	1e-5
HO058673	56	CAN70546	2	hypothetical protein	<i>V. vinifera.</i>	3e-9

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
J) Unknown function						
HO058678	60	XP_002330690	1	predicted protein	<i>P. trichocarpa</i>	3e-11
HO058683	66	XP_002263118	2	hypothetical protein	<i>V. vinifera</i>	1e-22
HO058689	72	YP_173374	7	hypothetical protein NitaMp027	<i>N. tabacum</i>	2e-41
HO058701	84	XP_002262814	1	hypothetical protein	<i>V. vinifera</i>	2e-40
HO058709	92	BAE98425	1	hypothetical protein	<i>A. thaliana</i>	5e-19
HO058713	96	EEE74739	2	hypothetical protein	<i>P. trichocarpa</i>	3e-27
HO058722	105	ABK92910	1	Unknown	<i>P. trichocarpa</i>	1e-07
HO058734	117	CAH59409	1	hypothetical protein	<i>P. major</i>	2e-6
HO058744	127	XP_002265589	1	hypothetical protein	<i>V. vinifera</i>	3e ⁻¹⁰
HO058760	143	XP_002262887	1	hypothetical protein	<i>P. trichocarpa</i>	1e-21
HO058782	165	XP_002266531	1	hypothetical protein	<i>V. vinifera</i>	1e-29
HO058796	179	XP_002325872	1	predicted protein	<i>P. trichocarpa</i>	3e-15
HO058804	187	XP_002535169	1	conserved hypothetical protein	<i>R. communis</i>	5e-17
HO058805	188	XP_002282465	1	hypothetical protein	<i>V. vinifera</i>	1e-4
HO058821	204	CAN66568	2	hypothetical protein	<i>V. vinifera</i>	2e-31
HO058825	208	XP_002525752	1	conserved hypothetical protein	<i>R. communis</i>	2e-26
HO058828	211	XP_002532855	2	conserved hypothetical protein	<i>R. communis</i>	1e-30
HO058834	217	ACU16813	1	unknown	<i>G. max</i>	1e-15
HO058838	221	XP_002533450	1	conserved hypothetical protein	<i>R. communis</i>	5e-35

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
J) Unknown function						
HO058850	233	XP_002525420	1	conserved hypothetical protein	<i>R. communis</i>	2e-40
HO058859	242	ACF06596	1	translationally controlled tumor protein	<i>Elaeis guineensis</i>	2e-76
HO058865	248	XP_002278536	1	hypothetical protein	<i>V. vinifera</i>	5e-46
HO058881	264	XP_002307128	1	predicted protein	<i>P. trichocarpa</i>	7e-92
HO058889	272	ACU17800	1	unknown	<i>G.max</i>	6e-94
HO058910	293	XP_002529167	1	Coiled-coil domain- containing protein, putative	<i>R. communis</i>	8e-76
HO058914	297	XP_002520165	1	conserved hypothetical protein	<i>R. communis</i>	1e-23
HO058915	298	CAO70096	1	unnamed protein product	<i>V. vinifera</i>	9e-19
HO058921	304	EEE60707	1	hypothetical protein	<i>O. sativa Japonica Group</i>	3e-33
HO058926	309	XP_002306682	1	predicted protein	<i>P. trichocarpa</i>	2e-99
HO058936	319	CBI25520	1	hypothetical protein	<i>V. vinifera</i>	8e-49
HO058937	320	ACU19325	2	unknown	<i>G max</i>	4e-39
HO058940	323	CBI38350	1	unnamed protein product	<i>V. vinifera</i>	7e-20
HO058943	326	XP_002306876	1	predicted protein	<i>P. trichocarpa</i>	3e-27
HO058944	327	XP_002302624	1	predicted protein	<i>P. trichocarpa</i>	2e-48
HO058620	3		2	No significant similarity found		

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
--	---------	-------------------------------	------------------------------	--------------------------	--	---------------------

K) No hit

HO058622	5		1	No significant similarity found		
HO058626	9		1	No significant similarity found		
HO058627	10		1	No significant similarity found		
HO058628	11		2	No significant similarity found		
HO058630	13		1	No significant similarity found		
HO058631	14		1	No significant similarity found		
HO058632	15		1	No significant similarity found		
HO058634	17		1	No significant similarity found		
HO058635	18		1	No significant similarity found		
HO058637	20		2	No significant similarity found		
HO058640	23		1	No significant similarity found		
HO058641	24		1	No significant similarity found		
HO058644	27		1	No significant similarity found		
HO058645	28		2	No significant similarity found		

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
K) No hit						
HO058646	29		2	No significant similarity found		
HO058647	30		2	No significant similarity found		
HO058649	32		1	No significant similarity found		
HO058651	34		1	No significant similarity found		
HO058653	36		1	No significant similarity found		
HO058654	37		1	No significant similarity found		
HO058655	38		1	No significant similarity found		
HO058659	42		2	No significant similarity found		
HO058661	44		1	No significant similarity found		
HO058664	47		1	No significant similarity found		
HO058666	49		1	No significant similarity found		
HO058669	52		1	No significant similarity found		
HO058671	54		2	No significant similarity found		
HO058672	55		1	No significant similarity found		

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
K) No hit						
HO058674	57		1	No significant similarity found		
HO058675	58		1	No significant similarity found		
HO058678	61		1	No significant similarity found		
HO058681	64		2	No significant similarity found		
HO058687	70		1	No significant similarity found		
HO058688	71		1	No significant similarity found		
HO058692	75		2	No significant similarity found		
HO058693	76		1	No significant similarity found		
HO058694	77		4	No significant similarity found		
HO058695	78		1	No significant similarity found		
HO058696	79		2	No significant similarity found		
HO058698	81		1	No significant similarity found		
HO058701	85		2	No significant similarity found		
HO058706	89		1	No significant similarity found		

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
K) No hit						
HO058714	97		1	No significant similarity found		
HO058715	98		1	No significant similarity found		
HO058716	99		1	No significant similarity found		
HO058717	100		1	No significant similarity found		
HO058720	103		1	No significant similarity found		
HO058721	104		1	No significant similarity found		
HO058723	106		1	No significant similarity found		
HO058724	107		1	No significant similarity found		
HO058725	108		2	No significant similarity found		
HO058726	109		1	No significant similarity found		
HO058727	110		1	No significant similarity found		
HO058728	111		1	No significant similarity found		
HO058729	112		1	No significant similarity found		
HO058730	113		1	No significant similarity found		

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
K) No hit						
HO058731	114		1	No significant similarity found		
HO058733	116		1	No significant similarity found		
HO058738	121		1	No significant similarity found		
HO058741	124		2	No significant similarity found		
HO058742	125		1	No significant similarity found		
HO058743	126		1	No significant similarity found		
HO058745	128		1	No significant similarity found		
HO058746	129		1	No significant similarity found		
HO058748	131		1	No significant similarity found		
HO058749	132		1	No significant similarity found		
HO058750	133		1	No significant similarity found		
HO058752	135		1	No significant similarity found		
HO058756	139		1	No significant similarity found		
HO058761	144		1	No significant similarity found		

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
K) No hit						
HO058762	145		1	No significant similarity found		
HO058766	149		1	No significant similarity found		
HO058769	152		1	No significant similarity found		
HO058771	154		2	No significant similarity found		
HO058778	161		1	No significant similarity found		
HO058779	162		1	No significant similarity found		
HO058780	163		1	No significant similarity found		
HO058781	164		1	No significant similarity found		
HO058784	167		1	No significant similarity found		
HO058786	169		1	No significant similarity found		
HO058790	173		1	No significant similarity found		
HO058794	177		1	No significant similarity found		
HO058795	178		1	No significant similarity found		
HO058797	180		1	No significant similarity found		

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
K) No hit						
HO058798	181		1	No significant similarity found		
HO058801	184		1	No significant similarity found		
HO058802	185		1	No significant similarity found		
HO058803	186		1	No significant similarity found		
HO058806	189		1	No significant similarity found		
HO058807	190		2	No significant similarity found		
HO058808	191		1	No significant similarity found		
HO058809	192		1	No significant similarity found		
HO058810	193		1	No significant similarity found		
HO058813	196		2	No significant similarity found		
HO058814	197		1	No significant similarity found		
HO058817	200		2	No significant similarity found		
HO058818	201		1	No significant similarity found		
HO058819	202		1	No significant similarity found		

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
K) No hit						
HO058824	207		1	No significant similarity found		
HO058826	209		2	No significant similarity found		
HO058827	210		1	No significant similarity found		
HO058829	212		1	No significant similarity found		
HO058832	215		1	No significant similarity found		
HO058835	218		1	No significant similarity found		
HO058840	223		1	No significant similarity found		
HO058842	225		2	No significant similarity found		
HO058843	226		2	No significant similarity found		
HO058845	228		1	No significant similarity found		
HO058846	229		1	No significant similarity found		
HO058847	230		1	No significant similarity found		
HO058848	231		1	No significant similarity found		
HO058851	234		1	No significant similarity found		

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
K) No hit						
HO058854	237		2	No significant similarity found		
HO058860	243		1	No significant similarity found		
HO058862	245		1	No significant similarity found		
HO058863	246		1	No significant similarity found		
HO058867	250		1	No significant similarity found		
HO058868	251		1	No significant similarity found		
HO058870	253		1	No significant similarity found		
HO058873	256		1	No significant similarity found		
HO058877	260		1	No significant similarity found		
HO058880	263		1	No significant similarity found		
HO058884	267		1	No significant similarity found		
HO058890	273		1	No significant similarity found		
HO058891	274		1	No significant similarity found		
HO058897	280		1	No significant similarity found		

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

GenBank Accession No. Unigene	Unigene	GenBank Accession match	No. ESTs per contig	Functional annotation	Matching organism GenBank Accession No.	E-value (Blastx)
K) No hit						
HO058901	284		1	No significant similarity found		
HO058908	291		1	No significant similarity found		
HO058918	301		1	No significant similarity found		
HO058919	302		1	No significant similarity found		
HO058933	316		1	No significant similarity found		
HO058934	317		1	No significant similarity found		
HO058945	328		2	No significant similarity found		
HO058946	329		2	No significant similarity found		

Supplemental Table II. Protein sequence identities of the *Opuntia streptacantha* OpsDHN1 protein and similar proteins from mono and dicotyledoneous plants

Identifier	Type dehydrin	Species	GenBank Accession no	% Identify
OpsDhn1	SK ₃	<i>Opuntia streptacantha</i>	HO058650	100
PvDhn	SK ₃	<i>Phaseolus vulgaris</i>	U54703	49
CcDH3	SK ₃	<i>Coffea canephora</i>	DQ333960	48
PmDhn1	SK ₃	<i>Plantago major</i>	AJ844000	45
Cadh1	SK ₃	<i>Capsicum annuum</i>	AY225438	42
Bcbdn1	SK ₃	<i>Boea crassifolia</i>	AF190474	40
OsDhn1	SK ₃	<i>Oryza sativa</i>	AY786415	39
At1g20450 (ERD10)	SK ₃	<i>Arabidopsis thaliana</i>	D17714	35
CbCOR29	SK ₃	<i>Capsella bursa-pastoris.</i>	DQ090957	33
At1g20440 (COR47)	SK ₃	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AB004872	33
At1g76180 (ERD14)	SK ₂	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_106267	44
BjDHN3	SK ₂	<i>Brassica juncea</i> L.	DQ441471	40
BjDHN2	SK ₂	<i>Brassica juncea</i> L.	DQ441470	34
At4g38410	SK ₂	<i>Arabidopsis thaliana</i>	BT003680	30
GbDHN	SK	<i>Ginkgo biloba</i>	AY847265	30
At1g54410	KS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AF325000	23
At4g39130	Y ₃ K	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_120073	15
Cldhn	YSK ₂	<i>Codonopsis lanceolata</i>	AB126059	28
HvDhn9	YSK ₂	<i>Hordeum vulgare</i>	X15289	26
Zmdhn1	YSK ₂	<i>Zea mays</i>	X15290	25
BcDh2	YSK ₂	<i>Boea crassifolia</i>	AY243045	24
TdDHN5	YSK ₂	<i>Triticum durum</i>	AY619566	18
At5g66400 (RAB18)	Y ₂ SK ₂	<i>Arabidopsis thaliana</i>	AF428458	23
At2g21490	Y ₂ SK ₂	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_127721	17
At3g50980 (Xero1, LT145)	YSK ₂	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NM_114958	32
PsDhn1	K ₂	<i>Pisum sativum</i>	NM_114958	15
At3g50970 (Xero2/LTI30)	K ₆	<i>Arabidopsis thaliana</i>	X77613	24

Supplemental Table III. Comparison of intron size and identity, and intron insertion within the nucleotides encoding the S-segment in DHNs from different plant species

Species	Accession No.	DHN-Type	size protein (aa)	Sequence motif **	Intron size (bp)
<i>Opuntia streptacantha</i> (OpsDHN1)	HO058650	SK3	248	SSSS^S	234
<i>Oryza sativa</i> (OsDHN1)	AAV49032	SK3	290	SSSSSSS^SS	94
<i>Oryza sativa</i> (ecp40)	AAX95254	YSK2	326	SSSSS^SSS	91
<i>Oryza sativa</i> (RAB16B)	AAX96129	YSK2	164	SSSSSS^SS	95
<i>Oryza sativa</i> (RAB16C)	AAX96131	YSK2	164	SSSSSS^SS	95
<i>Oryza sativa</i> (RAB16D)	AAX96132	YSK2	151	SSSSSSS^S	387
<i>Oryza sativa</i> (RAB21)	CAA68765	YSK2	163	SSSSSS^S	87
<i>Brassica juncea</i> (BjDHN1)	ABD95986	Y3SK2	243	SGSSSSSS^S	379
<i>Vitis riparia</i> (DHN1a)	AAW58105	SK ₂	130	SGSS^SSE	84
<i>Vitis riparia</i> (DHN1b)	AAW58107	SK ₂	124	SGSS^SSE	88
** <i>Medicago truncatula</i>	Medt3g162790.1	Y3SK2	196	SSSSSSSSSS^S	102
** <i>Manihot esculenta</i>	cassava15410.m1	Y3SK2	168	SSSSSSGS^SE	202
** <i>Populus trichocarpa</i>	POPTR_0004s16590	Y3SK	133	SSTSSSGT^SE	293
** <i>Populus trichocarpa</i>	POPTR_0009s12290	Y3SK2	183	SSTSSSGS^SE	255
<i>Physcomistrella patens</i>	AY365466	Y ₁₁ K	544	LVGSGT^GH	156
				SAGHH^LT	169
					another intron is located in the 5'-UTR

* Intron position is represented by an (^)

** Accession number obtained from the Phytozome database (<http://www.phytozome.net>)

Supplemental Figure 1.

1
2
3
4
5 gDNAOpsDHN1 GACAGCAAAGCAAAGCAAAGCAAAAAGAATCACTTGAGTCTCAATCCAGTCAGAGTCCTA 60
6 cDNAOpsDHN1 GACAGCAAAGCAAAGCAAAGCAAAAAGAATCACTTGAGTCTCAATCCAGTCAGAGTCCTA 60
7 *****
8
9 gDNAOpsDHN1 CGTACCAATTTCTGAAATGGCGGAAGAACACCAAAAAGGTGACAACGTGAACGTGGAGAG 120
10 cDNAOpsDHN1 CGTACCAATTTCTGAAATGGCGGAAGAACACCAAAAAGGTGACAACGTGAACGTGGAGAG 120
11 *****
12
13 gDNAOpsDHN1 CAGTGATCGCGGACTGTTTCGACTTCATGAAGAAGAACAAGGAGAGTGGTGATGAGAAGAA 180
14 cDNAOpsDHN1 CAGTGATCGCGGACTGTTTCGACTTCATGAAGAAGAACAAGGAGAGTGGTGATGAGAAGAA 180
15 *****
16
17 gDNAOpsDHN1 AGATCAAGAGGAGGTGATCGCCACTGAGTTCCACCACAAGGTGGAGGTTTCCAAGGAAGA 240
18 cDNAOpsDHN1 AGATCAAGAGGAGGTGATCGCCACTGAGTTCCACCACAAGGTGGAGGTTTCCAAGGAAGA 240
19 *****
20
21 gDNAOpsDHN1 CAAACACGACGAGAACAAGGAAGGTGGCCTTCTTCACAAGCTCCATCGTTCCGACGCCAG 300
22 cDNAOpsDHN1 CAAACACGACGAGAACAAGGAAGGTGGCCTTCTTCACAAGCTCCATCGTTCCGACGCCAG 300
23 *****
24
25 gDNAOpsDHN1 CTCCTCTTCT**GT**AAGTCCTTCCTTTTAGCTACTCTGATTTCTTTTCTTTCTTTATGTACG 360
26 cDNAOpsDHN1 CTCCTCTTCT----- 310
27 *****
28
29 gDNAOpsDHN1 CCATCGATCGTAGTTTATTTAGGCTCACTTTTTTTTTAAACATGTTTCAAACATTACATT 420
30 cDNAOpsDHN1 -----
31
32 gDNAOpsDHN1 CATAGTCAGAATTTATGTTAGGTTAATTCACCAATCATCGTTAAAATTTATCAAGGACTA 480
33 cDNAOpsDHN1 -----
34
35
36 gDNAOpsDHN1 TGGTAACAGTTGAAGATCGGAGAGTTTTTGGGGTCTCTAATTCCACAT**GTGAA**TTGATTT 540
37 cDNAOpsDHN1 -----
38
39
40 gDNAOpsDHN1 GC**AG**TCTGATGAGGAGGAGGGAGATGACGAAGACAAGAAGAGGAGGAAGAAGGAGAAGAA 600
41 cDNAOpsDHN1 ----TCTGATGAGGAGGAGGGAGATGACGAAGACAAGAAGAGGAGGAAGAAGGAGAAGAA 366
42 *****
43
44 gDNAOpsDHN1 AGAAAAGAAAGGATTGAAGGAGAAGATTAAGGAGAAACTTCCAGGCCACCACAAGGAGCA 660
45 cDNAOpsDHN1 AGAAAAGAAAGGATTGAAGGAGAAGATTAAGGAGAAACTTCCAGGCCACCACAAGGAGCA 426
46 *****
47
48 gDNAOpsDHN1 GGAAGAAGAACAAGAGGACAAGCAAAAAGGATCATCATCATCATCATGATGAAGAGGA 720
49 cDNAOpsDHN1 GGAAGAAGAACAAGAGGACAAGCAAAAAGGATCATCATCATCATCATGATGAAGAGGA 486
50 *****
51
52 gDNAOpsDHN1 CACCAATATAGCAATAGAGAAGATCCACGTGGAAGAGGTGATCTACTCGGAGCCATCTTA 780
53 cDNAOpsDHN1 CACCAATATAGCAATAGAGAAGATCCACGTGGAAGAGGTGATCTACTCGGAGCCATCTTA 546
54 *****
55
56 gDNAOpsDHN1 CCCTGCCCGGCCCCACCGCCACCTCATTTGGAGGCCGAAGGGGAGAAGAAGGGGCTGCT 840
57 cDNAOpsDHN1 CCCTGCCCGGCCCCACCGCCACCTCATTTGGAGGCCGAAGGGGAGAAGAAGGGGCTGCT 606
58 *****
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

```

gDNAOpsDHN1 TGAGAAGATCAAGGACAAGCTGCCAGGTCAGCACACAAGAAGGCCGAGGCCGAGCACGAGGT 900
cDNAOpsDHN1 TGAGAAGATCAAGGACAAGCTGCCAGGTCAGCACACAAGAAGGCCGAGGCCGAGCACGAGGT 666
*****

gDNAOpsDHN1 GGTCCCAACGGCCACTGCCACTGTGGCCGAGGGGGAGGCCAGGAGAAGAAGGGGTTTTT 960
cDNAOpsDHN1 GGTCCCAACGGCCACTGCCACTGTGGCCGAGGGGGAGGCCAGGAGAAGAAGGGGTTTTT 726
*****

gDNAOpsDHN1 GGACAAGATCAAGGAGAAGATCCCTGGCTTCCACTTTAAGGCTCCTGAGGAGGACAAGAA 1020
cDNAOpsDHN1 GGACAAGATCAAGGAGAAGATCCCTGGCTTCCACTTTAAGGCTCCTGAGGAGGACAAGAA 786
*****

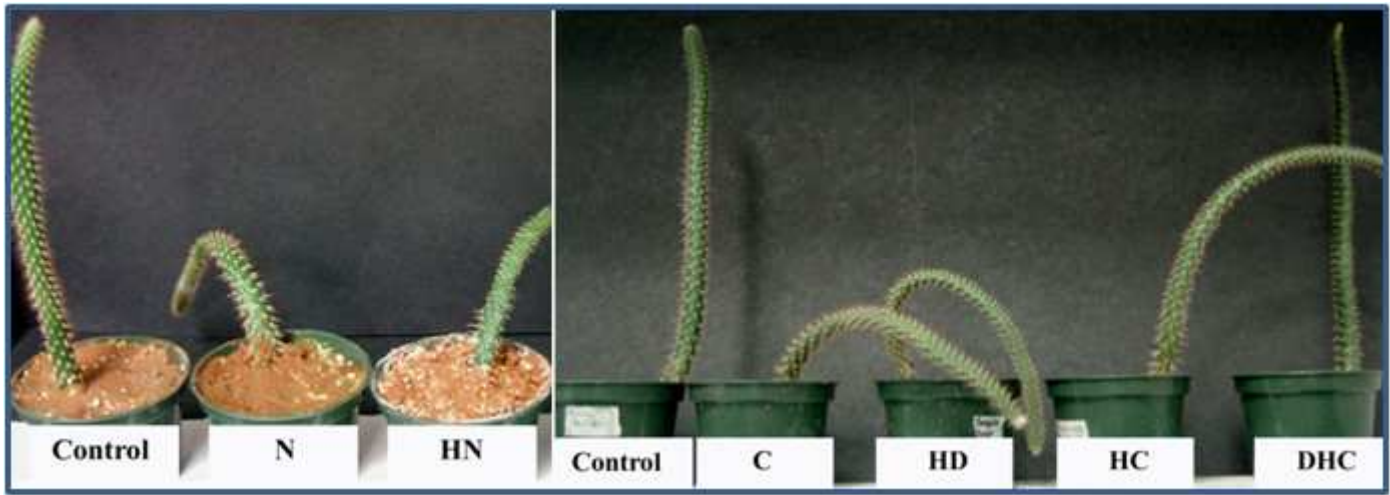
gDNAOpsDHN1 GGATGTGGAGTGTGATCAACCCCCTTCATCAACTTAAATTAATTATGGCTAATGCATGTTT 1080
cDNAOpsDHN1 GGATGTGGAGTGTGATCAACCCCCTTCATCAACTTAAATTAATTATGGCTAATGCATGTTT 846
*****

gDNAOpsDHN1 AATTATTGTTAATTTATTTTGGTTAATAAGTCAGGAACCTTTGATGATTTATGCTTTTCGA 1133
cDNAOpsDHN1 AATTATTGTTAATTTATTTTGGTTAATAAGTCAGGAACCTTTGATGATTTATGCTTTTCGA 906
*****

gDNAOpsDHN1 -----
cDNAOpsDHN1 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 934

```


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

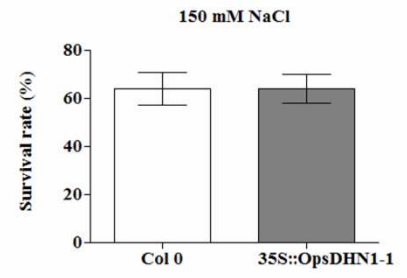


A

Col-0 35S::OpsDHN1-1 Col-0 35S::OpsDHN1-1



B



For Peer Review

DISCUSIÓN

Las plantas por ser organismos sésiles están continuamente expuestas a condiciones ambientales adversas, sin embargo en la actualidad dichas condiciones se están acentuando a consecuencia de la contaminación ambiental y del cambio climático que se está presentando en el planeta. Lo anterior provoca que las plantas no se puedan adaptar con facilidad a ese tipo de situaciones, y esto a su vez con lleva por un lado a la reducción de aérea vegetal en el planeta y por otro lado, a una pérdida significativa a nivel económico, debido a la baja productividad de los cultivos de interés agrícola a nivel mundial.

Uno de los más importante tipos de estrés abiótico son las bajas temperaturas, que provocan una deshidratación en la planta, que ocurre como resultado de un desbalance entre la absorción de agua a través de la raíz y la transpiración a través de las hojas (Kosová y col., 2007). Además el estrés por frío provoca cambios en la composición del citoplasma y daño en las membranas celulares. Por otro lado, los mecanismos de la planta para la aclimatación a bajas temperaturas originan un ajuste osmótico mediante la acumulación de solutos compatibles como sacarosa, rafinosa, sorbitol, manitol, glicinabetaína, prolina, entre otros, que de alguna manera disminuyen el potencia hídrico de los compartimientos celulares y así se previene la formación de cristales intracelulares, que son los causantes de un daño letal para las estructuras celulares (Goldstein y Nobel, 1991; Loik y Nobel, 1993a; Kosová y col., 2007). Sin embargo, existen algunas plantas en el planeta que son capaces de tolerar diversas condiciones ambientales adversas debido a que presentan ciertas características muy peculiares, que les permiten sobrevivir a dichas situaciones. Por ejemplo tenemos el caso del género *Opuntia*, mejor conocidas como el nopal, una planta que crece en ambientes de regiones áridas y semiáridas en el mundo, y también crecen en ambientes que sufren estrés por frío. El nopal presenta interesantes características morfológicas y fisiológicas para dicha tolerancia que le han permitido sobrevivir a dichas situaciones adversas, como cladodios suculentos que almacenan grandes cantidades de agua, la sustitución de hojas por espinas que ayudan a

condensar la humedad ambiental evitando así la transpiración, baja densidad de estomas hundidos que reduce el proceso de transpiración y por siguiente incrementa la eficiencia de uso del agua, la presencia de un metabolismo CAM, que permite la captación de CO₂ por la apertura de los estomas durante la noche, lo cual evita la pérdida del agua y metabolitos secundarios que ayudan en el mecanismo de respuesta al estrés (Gibson y Nobel, 1990; Raba y Martin, 2003; Black y Osmond, 2003). En particular, este género presenta algunas especies que son tolerantes a temperaturas extremas de congelamiento, tal es el caso de *Opuntia humifusa*, que es nativa del sur de Canadá y del Este de Estados Unidos, tolera temperaturas de -24 °C, y en caso de *O. fragilis* que crece al norte de Alberta, Canadá, sobrevive a tratamientos de temperaturas de -40 °C por tiempos cortos (Nobel y Loik, 1990, Loik y Nobel, 1993b). Además existen otras especies como *O. ficus-indica* y *O. streptacantha* que son nopales ampliamente cultivados en regiones semiáridas y áridas de México, que pueden tolerar temperaturas cercanas a -10 °C (Goldestein y Nobel, 1991).

Con base en lo anterior hemos considerado al nopal que es una planta de la familia de las Cactáceas y que presenta un metabolismo del tipo CAM, como un modelo muy interesante para estudiar mecanismos moleculares que están involucrados en la tolerancia al estrés abiótico en regiones áridas y semiáridas, que es el hábitat natural de este tipo de plantas.

En este trabajo se llevó acabo la construcción de una biblioteca de cDNA de nopal sometida a diversos tipos de estrés abiótico, para recopilar algunos unigenes relacionados a la respuesta del estrés, y otros de procesos generales de la célula.

De esta biblioteca se obtuvieron 329 unigenes de un total de 442 clonas, de los cuales el 9% representan aquellos genes que codifican proteínas que están relacionadas en respuesta al estrés tales como proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), ERD15 (Early Responsive to the Dehydration 15), ASR (Abscisic acid Stress Ripening protein), proteínas de transferencia de lípidos, de choque térmico, metalotioneínas, entre otras. Dentro de este grupo elegimos estudiar la caracterización molecular y funcional del unigen más abundante que se obtuvo en dicha biblioteca, que fue el gen que codifica para una dehidrina de tipo SK₃ (OpsDHN1), que pertenecen al grupo II de las

proteínas LEAs. Estas proteínas se acumulan durante la maduración de las semillas y polen, y se han reportado que están involucradas en respuesta al estrés tales como sequía, baja temperaturas y salinidad (Close 1996; Battaglia y col. 2008). Sin embargo, su función precisa a nivel molecular aún es desconocida, pero se ha sugerido que actúan como chaperonas estabilizando vesículas, proteínas y/o las estructuras de las membranas, secuestrador de radicales, unión a metales y actividad crioprotectora (Rorat 2006; Hara y col., 2005). Con base en el estudio filogenético realizado de la proteína *OpsDHN1* de nopal con respecto a otras, se mostró que está relacionada con las dehidrinas acídicas de *A.thaliana* del tipo SK₂ (ERD14) y SK₃ (ERD10 y COR47) que muestran un porcentaje de identidad del 44%, 35% y 33%, respectivamente. Dichas dehidrinas de *Arabidopsis* son reguladas bajo condiciones de estrés abiótico, principalmente bajo estrés por frío (Nylander y col., 2001). Los datos anteriores concuerdan con nuestros resultados del análisis de la expresión diferencial del gen *OpsDHN1* de nopal, en los cuales se observó una inducción notoria en respuesta al estrés por frío. También se observó que este gen es regulado por la aplicación exógena a ABA, de una manera dependiente de concentración y tiempo. Se ha reportado que la regulación de los genes que codifican dehidrinas por esta fitohormona es mediada por la presencia de elementos cis llamados ABRE y DRE que se encuentran en la región promotora (Busk y col. 1997), por lo tanto esto sugiere que la inducción del gen *OpsDHN1* bajo condiciones de algún estrés podría estar relacionada por la vía de señalización de ABA. Se ha reportado que las dehidrinas tienen la característica de unir metales mediante motivos conservados de histidina o por la motivos conservados de serina fosforilados que contienen las mismas, es por ello que intervienen en la protección contra la toxicidad de metales (Alsheikh y col., 2003; Hara y col., 2005; Zhang y col., 2006; Xu y col., 2008b). Con base en esto sería interesante analizar si dichos motivos del gen *OpsDHN1* de nopal tendría un papel interesante en la unión a metales. Por otro lado se llevó a cabo la caracterización funcional de dicho gen, con la finalidad de estudiar el posible papel que tiene el sobreexpresar dicho gen *OpsDHN1* de nopal en *Arabidopsis*, y analizarlo bajo condiciones de estrés. Para ello se generaron líneas transgénicas de *A. thaliana* que

sobreexpresan el gen de nopal mediante la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, las plantas transformadas se sometieron a diversos tipos de estrés, en el caso de estrés por congelamiento, este resultado mostró que hubo una alta tasa de sobrevivencia en comparación a la Col-0 después del tiempo de recuperación, sin embargo con el tratamiento con NaCl no hubo diferencias fenotípicas. Nuestros resultados concuerdan con los reportados en líneas transgénicas en *A. thaliana* en los que la sobreexpresión de la dehidrina RAB18 junto con las dehidrinas COR47 y la LT129 junto con LTI30 confieren tolerancia al estrés por congelamiento (Puhakainen y col., 2004). Con base en lo anterior, nuestros resultados sugieren que el gen *OpsDHN1* de nopal puede estar involucrado en los mecanismos de recuperación al estrés por congelamiento. El aislamiento de ESTs de nopal provee una información importante no solamente para entender los mecanismos moleculares en plantas de tipo CAM que son tolerantes a condiciones ambientales extremas y también son una herramienta útil para generar una base de datos de nopal, lo cual complementaría aquellos estudios bioquímicos y filogenéticos que se han hecho de este tipo de plantas.

Cuando las plantas son sometidas a estrés presentan una respuesta diferencial de acuerdo a sus estadios desarrollo. Por ello sería interesante estudiar la respuesta de las plantas en estadios tempranos como la germinación.

Se ha reportado en Cactáceas que la alta salinidad disminuye el porcentaje de germinación (Romero-Schmidt y col., 1992; Nolasco y col., 1996; Vega-Villasante y col., 1996). Este tipo de estrés ocasiona un alto potencial osmótico en la semilla, lo cual impide la entrada de agua o provoca efectos tóxicos de iones Na^+ y Cl^- (Okçu y col., 2005). Por lo tanto para que las plantas puedan sobrellevar el estrés intervienen una acumulación de solutos compatibles como lo son la prolina, la cual actúa como estabilizador de estructuras celulares, secuestrador de radicales (Kavi-Kishor y col., 2005), también pudiera actuar como componente de la vía de traducción de señalización que regula aquellos genes relacionados en respuesta al estrés (Khedr y col., 2003) y se ha sugerido que tiene un posible papel durante la germinación de las semillas (Poljakoff-Mayber y col., 1994). Otro de los

componentes son las poliaminas que además de estar implicadas en respuestas al estrés abiótico como biótico, también están involucrados en algunos procesos fisiológicos (Bouchereau y col., 1999; Jiménez-Bremont y col., 2006, 2007; Rodríguez-Kessler y col., 2006, 2008), y en potenciar en la germinación de semillas en algunas especies de plantas (Prakash y Prathapasenan, 1998; Sínka y Lewandoska, 1991; Zeid y Ceded, 2006). Para ello, en este segundo trabajo se realizaron experimentos sometiendo a las semillas de nopal a condiciones de estrés salino y aplicándoles compuestos que están implicados en respuesta al estrés como lo son la prolina (1 y 10 mM) y las poliaminas (1 μ M cada una), con la finalidad de determinar si estos compuestos ayudan al rompimiento de la latencia de las semillas y también benefician a la germinación cuando las semillas estas sometidas a condiciones de estrés salino (NaCl a 25, 50 y 75 mM). Nuestros resultados demostraron que las tratamientos tanto de prolina como poliaminas sin estrés salino no beneficiaron al rompimiento de la latencia de las semillas. En cuanto a los tratamientos con las diferentes concentraciones de sal, la germinación fue afectada drásticamente especialmente a las concentraciones de NaCl a 50 y 75 mM y el caso de los tratamientos de sal junto con prolina o poliaminas, respectivamente, no hubo diferencias en el mejoramiento de la germinación en presencia del estrés, a excepción de Spm donde se observó solo el 4% de germinación a la concentración de NaCl a 75 mM, tal vez este dato se pueda sugerir que este tipo de poliaminas están involucradas en el mecanismo de tolerancia al estrés salino durante la germinación, tal como se ha reportado en algunas especies de plantas (Zapata y col., 2004).

De manera general la información obtenida de estos trabajos tanto a nivel molecular como fisiológico aportaría mayor conocimiento y complementaria todos aquellos estudios tanto bioquímicos como filogenéticos que se han hecho en plantas de tipo CAM, para tratar de entender como estas plantas manejan su mecanismo de defensa en estrés en ambientes áridos y semiáridos, que es el hábitat natural de este tipo de plantas.

REFERENCIAS

Allagulova C.R., Gimalow F.R., Shakirova F.M. y Vakhitov V.A. (2003) The Plant dehydrins: Structure and putative functions. *Biochemistry (Moscow)* **68**, 1157-1165.

Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse, T.J., Kim C.J., Chen H. y col. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* **301**, 653-657.

Alsheikh M.K., Heyen B.J. y Randall S.K. (2003) Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 40882-40889.

Amitai-Zeigerson H., Scolnik P.A. y Bar-Zvi D. (1994) Genomic nucleotide sequence of tomato *Asr2*, a second member of the stress/ripening induced *Asr1* gene family. *Plant Physiology* **106**, 1699–1700.

Aronel V., Vergnolle C., Cantrel C. y Kader J. C. (2000) Lipid transfer proteins are encoded by a small multigene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* **157**, 1–12.

Bae E-K., Lee H., Lee J-S. y Noh E-W. (2009) Differential expression of a apoplar SK₂-type dehydrin gene in response to various stresses. *Biochemistry and Molecular Biology Reports* **27**, 439-443.

Bartels D. y Sunkar R. (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Science* **24**, 23-58.

- Battista J.R, Park M.J. y McLemore A.E (2001) Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *Deinococcus radiodurans* R1 to desiccation. *Cryobiology* **43**, 113-139.
- Basset C.L., Wisniewski M.E., Artlip T.S., Richart G., Norelli J.L. y Farrell Jr R.E. (2009) Comparative expression and transcript initiation of three peach dehydrin genes. *Planta* **230**, 107-118.
- Battaglia M., Olvera-Carrillo Y., Garcarrubio A., Campos F. y Covarrubias A.A. (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology* **148**, 6-24.
- Black C.C. y Osmond C.B. (2003) Crassulacean acid metabolism photosynthesis: 'working the night shift'. *Photosynthesis Research* **76**, 329-341.
- Bies-Ethève N., Gaubier-Comella P., Debures A., Lasserre E., Jobet E., Raynal M., Cooke R. y Delseny M. (2008) Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **67**, 107-124.
- Birnboim H.C. y Doly J.A. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Research* **7**, 1513-23.
- Borovskii G.B., Stupnikova I.V., Antipina A.I., Vladimirova S.V. y Voinikov, V.K. (2002) Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant Biology* **2**, 1-7.
- Bouchereau, A., Aziz A., Larher F. y Martin-Tanguy J. (1999). Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Science* **140**,103-125.

Bray E.A. (1997) Plant responses to water deficit. *Trends Plant Science* **2**, 48-54.

Brini F., Hanin M., Lumbreras V., Amara I., Khoudi H., Hassairi A., Pagès M. y Masmoudi K. (2007) Overexpression of wheat dehydrin DHN-5 enhances tolerance to salt and osmotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* **26**, 2017-2026.

Brosché M., Overmyer K., Wrzaczek M., Kangasjärvi J. y Kangasjärvi S. (2010) Stress Signaling III: Reactive Oxygen Species (ROS). *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation* Springer, Dordrecht, The Netherlands pp. 91 –102.

Browne J.A., Dolan K.M., Tyson T., Goyal K., Tunnacliffe A. y Burnell A.M. (2004) Dehydration-specific induction of hydrophilic protein genes in the anhydrobiotic nematode *Aphelenchus avenae*. *Eukaryotic Cell* **3**, 966-975.

Busk P.K., Jensen A.B. y Pagès M. (1997) Regulatory elements *in vivo* in the promoter of the abscisic acid responsive gene *rab17* from maize. *The Plant Journal* **11**, 1285-1295.

Carpenter J.F y Crowe J.H. (1988) The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* **25**, 244-255.

Chaves M.M., Maroco J.P. y Pereira J.S. (2003) Understanding plant responses to drought from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* **30**, 239-264.

Chaumont F., Barrieu F., Wojcik E., Chrispeels M. J. y Jung R. (2001). Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize1. *Plant Physiology* **125**, 1206-1215.

- Chung E., Kim S-Y., Yi S.Y. y Choi D. (2003) *Capsicum annuum* dehydrin, an osmotic-stress gene in hot pepper plants. *Molecules and Cells* **15**, 327-332.
- Close T.J. y Lammers, P.J. (1993) An osmotic stress protein of cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins. *Plant Physiology* **101**, 773-779.
- Close J.T. (1996) Dehydrins: Emergence of a biochemical role of family of plant dehydration proteins. *Physiologia Plantarum* **97**, 795-803.
- Close J.T. (1997) Dehydrins: A commonalty in the response of plants to dehydration. *Physiologia Plantarum* **100**, 291-296.
- Cohen A., Plant A.L., Moses M.S. y Bray E.A. (1991) Organ-specific and environmentally regulated expression of two abscisic acid-induced genes of tomato: nucleotide sequence and analysis of the corresponding cDNAs. *Plant Physiology* **97**, 1367–1374.
- Colmenero-Flores J.M., Moreno L.P., Smith C. y Covarrubias A.A. (1999) PvLEA18. a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulate during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiology* **120**, 93-103.
- Danyluk J., Perron A., Houde M., Limin A., Fowler B., Benhamou N y Sarhan F (1998) Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell* **10**, 623-638.
- Doczi R., Kondrak M., Kovacs G., Beczner F y Banfalvi Z. (2005) Conservation of the drought-inducible DS2 genes and divergences from their ASR paralogues in solanaceous species. *Plant Physiology and Biochemistry* **43**, 269-276.

- Dure L. (1993) A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *The Plant Journal* **3**, 363-369.
- Dure L. (2001) Occurrence of a repeating 11-mer amino acid sequences motif in diverse organisms. *Protein and Peptide Letters* **8**, 115–122.
- Dyson H.J. y Wright P.E. (2005). Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 197-208.
- Fan Z. y Wang X. (2006) Isolation and characterization of a novel dehydrin gene from *Capsella bursa-pastoris*. *Molecular Biology* **40**, 43-50.
- Feder M.E. y Hofmann G.E. (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual Review of Physiology* **61**, 243-282.
- Felsenstein J. (1989) PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* **5**, 164-166.
- Flores-Valdes C., Luna-Esquivel J.M. y Ramírez-Moreno P.P. (1995) Mercado Mundial de la Tuna. *Reporte técnico para a apoyos y servicios a la comercialización agropecuaria* (ACERCA), Chapingo, México. pp. 117.
- Gal T.Z., Glazer I. y Koltai H. (2004) An LEA group 3 family member is involved in survival of *C. elegans* during exposure to stress. *FEBS Letters* **577**, 21-26.
- Garay-Arroyo A., Colmenero-Flores J.M. Garcíarrubio A. y Covarrubias A.A. (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *The Journal of Biological Chemistry* **275**, 5668-5674.

- Gilles G.J., Hines K.M., Manfre A.J. y Marcotte W.R. Jr (2007) A predicted N-terminal helical domain of a group 1 LEA protein is required for protection of enzyme activity from drying. *Plant Physiology Biochemical* **45**, 389–399.
- Gong D., Guo Y., Schumaker K. S. y Zhu J. K. (2004) The SOS3 Family of Calcium Sensors and SOS2 Family of Protein Kinases in Arabidopsis. *Plant Physiology*, **134**, 919–926.
- Goday A., Jensen A.B., Culianez-Macia F.A., Alba M.M., Figueras M., Serratos J., Torres M. y Pages M. (1994) The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 es located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell* **6**, 351-360.
- Goldgur Y., Rom S., Ghirlando R., Shkolnik D., Shadrin N., Konrad Z. y BarZvi D. (2007) Desiccation and zinc binding induce transition of tomato abscisic acid stress ripening 1, a water stress- and salt stress-regulated plant-specific protein, from unfolded to folded state. *Plant Physiology* **143**, 617–628.
- Goldstein G., y Nobel P.S. (1991) Changes in osmotic pressure and mucilage during low-temperature acclimation of *Opuntia ficus-indica*. *Plant Physiology* **97**, 954-961.
- González-Durán A., Riojas-López M.E. y Arreola-Nava H.J. (2001) El género *Opuntia* en Jalisco. *Guía de campo. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad* pp. 135.
- Goyal K., Walton L.J. y Tunnacliffe A. (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochemical Journal* **388**, 151–157.

- Grelet J., Benamar A., Teyssier E., Avelange-Macherel M.H., Grunwald D. y Macherel D. (2005) Identification in pea seed mitochondria of late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiology* **137**, 157-167.
- Guo W., Ward R.W. y Thomashow M.F. (1992) Characterization of a cold regulated wheat gene related to *Arabidopsis* Cor47. *Plant Physiology* **100**, 915–922.
- Hand S.C., Jones D., Menze M.A. y Witt T.L. (2007) Life without water: expression of plant LEA genes by an anhydrobiotic arthropod. *Journal of Experimental Zoology Part A Ecological Genetics Physiology* **307**, 62–66.
- Hara M., Wakasugi Y., Ikoma Y., Yano M., Ogawa K y Kuboi T. (1999) cDNA sequence and expression of a cold-responsive gene in *Citrus unshiu*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **63**, 433-437.
- Hara M., Terashima S. y Kuboi T. (2001) Characterization and cryoprotective activity of cold-responsive dehydrin from *Citrus unshiu*. *Journal of Plant Physiology* **158**:1333-1339.
- Hara M., Terashima S., Fukaya T. y Kuboi T. (2003) Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. *Planta* **217**, 290-298.
- Hara M., Fujinaga M. y Kuboi T. (2005) Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. *The Journal of Biological Chemistry* **56**, 2695-2703.
- Heckathorn S.A., Mueller J.K., La Guidice S., Zhu B., Barret T., Blair B. y Dong Y. (2004) Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. *American Journal of Botany* **91**, 1312-1318.

- Hepler P.K. (2005) Calcium: a central regulator of plant growth and development. *Plant Cell* **17**, 2142–2155.
- Hirt H. y Shinozaki K. (2003) Plant Responses to abiotic stress. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 75-101 pp.
- Hoagland D. R. y Arnon D. I. (1950) The water-culture method for growing plants without soil. In *California Agricultura. Experimental Station. Circular*. 347.
- Hollenbach B., Schreiber L., Hartung W. y Dietz K.J. (1997) Cadmium leads to stimulated expression of the lipid transfer protein genes in barley: implications for the involvement of lipid transfer proteins in wax assembly. *Planta* **203**, 9–19.
- Huang J. y Zhu J.K. (2004) Plant response to stress: abscisic acid and water stress. *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. DOI: 10.1081/E-EPCS 120010655.
- Hundertmark M. y Hinch D.K. (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC genomics* **9**, 1-22.
- Jang C.S., Kim D.S., Bu S.Y., Kim J.B., Lee S.S., Kim J. Y., Johnson J.W. y Seo Y.W. (2002) Isolation and characterization of lipid transfer protein (LTP) genes from a wheat-rye translocation line *Plant Cell Reports* **20**, 961–966.
- Javot H., Lauvergeat V., Santoni V., Martin-Laurent F., Güclü J y col. (2003). Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. *Plant Cell* **15**, 509–22.

- Jiménez-Bremont J.F., Becerra-Flora A., Hernández-Lucero E., Rodríguez-Kessler M., Acosta-Gallegos J.A. y Ramírez-Pimentel J.G. (2006). Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine. *Biologia Plantarum* **50**,763-766.
- Jiménez-Bremont, J.F., Ruiz O.A. y Rodríguez-Kessler M. (2007). Modulation of spermine levels in maize seedlings subjected to long-term salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry*. **45**, 812-821.
- Johanson U., Karlsson M., Johansson I., Gustavsson S., Sjövall S., Fraysse L., Weig A. R.y Kjellbom P. (2001) The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in Arabidopsis provides a frame work for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiology* **126**, 1358–1369.
- Jung H.W., Kim W. y Hwang B.K. (2003) Three pathogen-inducible genes encoding lipid transfer protein from pepper are differentially activated by pathogens, abiotic, and environmental stresses. *Plant Cell and Environment* **26**, 915–928.
- Kader J.C., Julienne M. y Vergnolle C. (1984) Purification and characterization of a spinach leaf protein capable of transferring phospholipids from liposomes to mitochondria or chloroplasts. *European Journal Biochemistry* **139**, 411–416.
- Kader J.C. (1996) Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Reviews Plant Physiology Plant Molecular. Biology* **47**, 627–54.
- Kalifa Y., Gilad A., Konrad Z., Zaccari M., Scolnik P.A. y Bar-Zvi D. (2004a) The water- and salt-stress-regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein. *Biochemical Journal* **381**: 373–378.

- Kalifa Y., Perlson E., Gilad A., Konrad Z., Scolnik P.A. y Bar-Zvi D. (2004b) Over-expression of the water and salt stress-regulated *Asr1* gene confers an increased salt tolerance. *Plant, Cell and Environment* **27**, 1459–1468.
- Kamisugi Y., Cuming A.C. y Cove D.J. (2005) Parameters determining the efficiency of gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acids Research* **33**, 2-10.
- Kaplan B., Davydov O., Knight H., Galon Y., Knight M.R., Fluhr R., y Fromm H. (2006). Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca²⁺ transients reveal ABRE-related sequences as Ca²⁺-responsive cis elements in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 2733–2748.
- Kaur N. y Gupta A.K. (2005) Signal transduction pathways under abiotic stresses in plants. *Current Science* **88**, 1771-1780.
- Kavi-Kishor, P.B., Sangam S., Amrutha R.N., Sri Laxmi P., Naidu K.R, Rao K.R.S.S., Rao S., Reddy K.J., Theriappan P. y Sreenivasulu N. (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* **88**, 424-438.
- Khedr, A.H.A Abbas, M.A., Wahid A.A.A., Quick W.P. y Abogadallah G.M. (2003) Proline induces the expression of salt-stress-responsive proteins and may improve the adaptation of *Pancratium maritimum* L. to salt-stress. *Journal of Experimental Botany* **54**,2553-2562.
- Kim H.S., Lee J.H., Kim J.J. Kim C.H., Jun S.S. y Hong Y.N. (2005) Molecular and functional characterization of *CaLEa6*, the gene for a hydrophobic LEA protein from *Capsicum annum*. *Gene* **344**, 115-123.

- Koag M.C., Fenton R.D., Wilkens S. y Close T.J. (2003) The binding of maize DHN1 to lipid vesicles: gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiology* **131**, 309–316.
- Kosová K., Vítámvás P. y Prásil I.T. (2007) The role of dehydrins in plant response to cold. *Biologia Plantarum* **51**, 601-617.
- Kovacs D., Kalmar E., Torok Z. y Tompa P. (2008) Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiology* **147**, 381-390.
- Kruger C., Berkowitz O., Stephan U. W., y col. (2002). A metal binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. *The Journal of Biological Chemistry* **277**, 25062–25069.
- Kyte J. y Doolittle R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal Molecular Biology* **157**, 105–132.
- Kusano T., Aguan K., Abe M. y Sugawara K. (1992) Nucleotide sequences of a rice rab16 homologue gene. *Plant Molecular Biology* **18**, 127-129.
- Lee S.C., Lee M.Y., Kim S.J., Jun S.H., An G. y Kim S.R. (2005) Characterization of an abiotic stress-inducible dehydrin gene, *OsDhn1*, in rice (*Oriza sativa* L.). *Molecules and Cells* **19**, 212-218.
- Li A, Wang X., Leseberg C.H., Jia J y Mao L. (2008). Biotic and abiotic stress responses through calcium-dependent protein kinase (CDPK) signaling in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Signaling and Behavior* **3**, 654-656.

- Livak K. J. y Schmittgen T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Liu N.Y., Ko S.S., Yeh K.C. y Charng Y.T. (2006). Isolation and characterization of tomato Hsa32 encoding a novel heat-shock protein. *Plant Science* **170**, 976-985.
- Loik M. E. y Nobel P.S. (1993a). Exogenous abscisic acid mimics cold acclimation for cacti differing in freezing tolerance. *Plant Physiology* **103**, 871-876.
- Loik M. E. y Nobel P.S. (1993b). Freezing tolerance and water relations of *Opuntia fragilis* from Canada and the United States. *Ecology* **74**, 1722-1732.
- López-González J.J, Fuentes-Rodríguez J.M., & Rodríguez-Gámez A. (1997). Industrialización de la tuna Cardona (*Opuntia streptacantha*). *Journal of the Professional Association for Cactus Development* **2**, 169-175.
- Manajan S. y Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **444**, 139-158.
- Manfre A.J., Lanni L.M y MarcotteWR Jr (2006) The Arabidopsis group 1 late embryogenesis abundant protein ATEM6 is required for normal seed development. *Plant Physiology* **140**: 140–149.
- Marttila S., Tenhola T. y Mikkonen A. (1996) A barley (*Hordeum vulgare* L) LEA3 protein, HVA1, is abundant in protein storage vacuoles. *Planta* **199**, 602–611.
- Maurel C y Chrispeels M.J. (2001) Aquaporins: a molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology* **125**, 135-138.

- Maurel Christophe, Verdoucq Lionel, Luu Doan-Trung y Santoni V´eronique (2008) Plant Aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review Plant Biology* **59**, 595–624.
- Minami A., Nagao M., Ikegami K., Koshiha T., Arakawa K., Fujikawa S. y Takezawa D. (2005) Cold acclimation in bryophytes: low-temperature-induced freezing tolerance in *Physcomitrella patens* is associated with increases in expression levels of stress-related genes but not with increase in level of endogenous abscisic acid. *Plant* **220**, 414-423.
- Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science* **7**, 405-410.
- Mittler R. (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* **11**, 15-19.
- Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley D.S. y Koornneef M. (1998) Analysis *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome. *Science* **282**, 662-682.
- Molina A, y Garcia-Olmedo F (1993) Developmental and pathogen induced expression of three barley genes encoding lipid transfer protein. *Plant Journal* **4**, 983–991.
- Mundree S.G., Baker B., Mowla S., Peters S., Marais S., Willigen C.V., Govender K., Maredza A., Muyanga S., Farrant J.M. y Thomson J.A. (2002) Physiological and molecular insights into drought tolerance. *African Journal of Biotechnology* **1**, 28–38.

- Mundy J. y Chua N.H. (1988) Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *The EMBO Journal* **7**, 2279–2286.
- Munnik T. y Meijer J.G. (2001) Osmotic stress activates distinct lipid and MAPK signalling pathways in plants. *FEBS Letters* **498**, 172-178.
- NDong C., Danyluk J., Wilson K.E., Pocock T., Huner N.P. y Sarhan F (2002) Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins: molecular characterization and functional analyses. *Plant Physiology* **129**: 1368–1381.
- Neven L.G., Haskell D.W., Hofig A., Li Q-B y Guy C. L. (1993) Characterization of a spinach gene responsive to low temperature and water stress. *Plant Molecular Biology* **21**, 291-305.
- Nobel P.S. y Loik M.E. (1990). Thermal analysis, cell viability, and CO₂ uptake of a widely distributed North American cactus, *Opuntia humifusa*, at subzero temperatures. *Plant Physiology and Biochemistry* **28**, 429-436.
- Nobel P.S. (1997) Recent Ecophysiological Findings for *Opuntia ficus-indica*. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* **2**, 89-96.
- Nobel P.S. (1998) Los incomparables agaves y cactus. Ed. Trillas. México. 56 pp.
- Nobel P.S y Bobich E.G. (2002) Environmental Biology. En *Cacti: Biology and Uses* (ed. P.S. Nobel) pp. 57-74 Berkeley, California, USA: University of California Press.
- Nolasco, H., Vega-Villasante F., Romero-Schmidt H.L., y A. Díaz-Rondero. 1996. The effects of salinity, acidity, light and temperature on the germination of seeds of cardón (*Pachycereus pringlei* (S.Wats) Britton & Rose, Cactaceae). *Journal of Arid Environments* **33**, 87-94.

- Nuccio M.L., Rhodes D., McNeil S.D. y Hanson A.D. (1999) Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Current Opinion Plant Biology* **2**, 128-134.
- Nylander M., Svensson J., Palva E.T. y Welin B.V. (2001) Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **45**, 263-279.
- Okçu, G., Kaya M. D. y Atak M. (2005). Effects of salt and drought stresses on germination and seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **29**, 237-242.
- Olvera-Carrillo Y., Campos F., Reyes J. L., Garcíarrubio A. y. Covarrubias Alejandra A. (2010). Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **154**, 373–390.
- Oullet F. (2007) Cold acclimation and freezing tolerance in plants. *Encyclopedia of life sciences* 1-6.
- Padmanabhan V., Dias D.M. y Newton R.J. (1997) Expression analysis of a gene family in loblolly pine (*Pinus taeda* L.) induced by water deficit stress. *Plant Molecular Biology* **35**, 801–807.
- Page, D. R. y Grossniklaus U. (2002) The art and design of genetic screens: *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics* **3**,124–136.

- Park J.A., Cho S.K., Kim J.E., Chung H.S., Hong J.P., Hwang B., Hong C.B. y Kim W.T. (2003) Isolation of cDNAs differentially expressed in response to drought stress and characterization of the *Ca-LEAL1* gene encoding a new family of atypical LEA-like protein homologue in hot pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Pukang). *Plant Science* **165**, 471–481.
- Pearce R.S. (1999) Molecular analysis of acclimation to cold. *Plant Growth Regulation* **29**, 47–76.
- Pimienta-Barrios E. (1994) Prickly pear (*Opuntia* spp.): A valuable fruit crop for the semi-arid lands of Mexico. *Journal of Arid Environments* **28**, 1-11.
- Pih K.T., Lim J.H., Kang S.G., Piao H.L., Jin, J.B. y Hwang I.H. (1999) Characterization of two new channel protein genes in *Arabidopsis*. *Molecules and Cells* **9**, 84-90.
- Poljakoff-Mayber, A., Somers G.F., Werker E., y Gallagher J.L. (1994) Seeds of *Kosteletzkya virginica* (Malvaceae): Their structure, germination, and salt tolerance. II germination and salt tolerance. *American Journal of Botany* **81**, 54-59.
- Prakash L. y Prathapasenan G. (1988) Putrescine reduces NaCl-induced inhibition of germination and early seedling growth of rice (*Oryza sativa* L.). *Australian Journal of Plant Physiology* **15**, 761-767.
- Prasad, T.K., Anderson, M.D., Martin, B.A. y Stewart, C.R. (1994). Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize seedlings and a regulatory role for hydrogen peroxide. *Plant Cell* **6**, 65-74.
- Puhakainen T., Hess M.W., Makela P., Svensson J., Heino P. y Palva E.T. (2004) Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **54**, 743-753.

- Quigley F., Rosenberg J.M., Shachar-Hill Y. y Bohnert H.J. (2001) From genome to function: the Arabidopsis aquaporins. *Genome Biology* **3**, 1–17.
- Rabas A.R. y Martin C.E. (2003) Movement of water from old to young leaves in three species of succulents. *Annals of Botany* **92**, 529-536.
- Reyes J.L., Rodrigo M.J., Colmenero-Flores J.M., Gil J.V., Garay-Arroyo A., Campos F., Salamini F., Bartels D. y Covarrubias A.A. (2005) Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell and Environment* **28**, 709-718.
- Reyes-Agüero J.A., Aguirre J.R. y Valiente-Banuet A. (2006) Reproductive biology of Opuntia: A review. *Journal of Arid Environments* **64**, 549–585.
- Ríos R. J. y Quintana M. (2004) Manejo general del cultivo del nopal. Colegio de Postgraduados, Secretaría de la Reforma Agraria. Manual del participante. México. 1-81 pp.
- Rock C. (2000) Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytologist* **148**, 357-396.
- Rodríguez M., Canales E. y Barrás-Hidalgo O. (2005) Molecular aspects of abiotic stress in plants. *Bioteconología aplicada* **22**. 1-10.
- Rodríguez-Kessler, M., Alpuche-Solís A. G., Ruiz O.A. y J.F. Jiménez-Bremont. (2006). Effect of salt stress on the regulation of maize (*Zea mays* L.) genes involved in polyamine biosynthesis. *Plant Growth Regulation* **48**, 175-185.
- Rodríguez-Kessler M., Ruiz O.A., Maiale S., Ruiz-Herrera J. y Jiménez-Bremont J.F. (2008) Polyamine metabolism in maize tumors induced by *Ustilago maydis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**, 805-814.

- Romero-Schmidt, H.L., Vega-Villasante F., Nolasco H. y Montaña C. (1992). The effect of darkness, freezing, acidity and salinity on seed germination of *Ferocactus peninsulae* (Cactaceae). *Journal of Arid Environments* **23**, 389-395.
- Rorat T., Szabala B.M., Grygorowicz W.J., Wojtowicz B., Yin Z. y Rey P. (2006) Expression of SK3-type dehydrin in transporting organs is associated with cold acclimation in *Solanum* species. *Planta* **224**, 205–221.
- Sabehat A., Lurie S. y Weiss D. (1998) Expression of small heat-shock proteins at low temperatures. *Plant Physiology* **117**, 651–658.
- Sahu B.B. y Shaw B.P. (2009) Isolation, identification and expression analysis of salt-induced genes in *Suaeda maritime*, a natural halophyte, using PCR-based suppression subtractive hybridization. *BMC Plant Biology* **9**, 1-25.
- Sairam R.K. y Tyagi A. (2004) Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Current Science* **86**, 407-421.
- Sakurai J., Ishikawa F., Yamaguchi T., Uemura M. y Maeshima M. (2005). Identification of 33 rice aquaporin genes and analysis of their expression and function. *Plant and Cell Physiology* **46**, 1568–1577.
- Sáenz, C., Berger H., Corrales García, J., Galletti L. y col. (2006) Utilización agroindustrial del nopal. Boletín de servicios agrícolas de la FAO 162.
- Seki M., Narusaka M., Abe H., Kasuga M., Yamaguchi-Shinozaki K., Carninci P., Hayashizaki Y. y Shinozaki K (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* **13**, 61–72.

- Shakirova F.M., Allagulova C.R., Bezrukova A.M., Aval'baev A.M. y Gimalov F.R. (2009) The role of endogenous ABA in cold-induced expression of the *TADHN* dehydrin gene in wheat seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology* **56**, 720-723.
- Shen Y., Tang M. J., Hu Y.L. y Lin Z.P. (2004) Isolation and characterization of a dehydrin-like gene from drought-tolerant *Boea crassifolia*. *Plant Science* **166**, 1167-11175.
- Shi H. y Zhu J.K. (2002) *SOS4*, a pyridoxal kinase gene, is required for root hair development in Arabidopsis. *Plant Physiology* **129**, 585–593.
- Shinosaki K. y Yamaguchi-Shinozaki K. (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology* **115**, 327-334.
- Silhavy D., Hutvagner G., Barta E. y Banfalvi Z. (1995) Isolation and characterization of a water-stress-inducible cDNA clone from *Solanum chacoense*. *Plant Molecular Biology* **27**, 587–595.
- Singh A.K., Sopory S.K. Wu R. y Singla-Pareek S.L. (2010). Transgenic Approaches. *Abiotic Stress Adaptation in Plants: Physiological, Molecular and Genomic Foundation*. Springer, pp. 418-438.
- Sińska, I. y Lewandowska U. (1991). Polyamines and ethylene in the removal of embryonal dormancy in apple seeds. *Physiologia Plantarum* **8**, 59-64.
- Solanke A U. y Sharma A.K. (2008) Signal transduction during cold stress in plants. *Physiology and Molecular Biology of Plants* **14**, 69-79.

- Solomon A., Salomon R., Paperna I. y Glazer I. (2000) Desiccation stress of entomopathogenic nematodes induces the accumulation of a novel heat stable protein. *Parasitology* **121**, 409–416.
- Sossountzov L., Ruiz-Avila L., Vignols F., Jolliot A., Arondel V., Tchang F., Grosbiso M., Guerbette F., Miginiac E., Delseny M., Puigdomenèch P. y Kader J.C. (1991) Spatial and temporal expression of a maize lipid transfer protein gene. *Plant Cell* **3**, 923–933
- Stacy R.A.P. y Aalen R.B. (1998) Identification of sequence homology between the internal hydrophilic repeated motifs of group 1 late-embryogenesis abundant proteins in plants and hydrophilic repeats of the general stress protein GsiB of *Bacillus subtilis*. *Planta* **206**, 476–478.
- Stintzing F.C y Carle R (2005) Cactus stems (*Opuntia* spp): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition and Food Research* **49**,175-194.
- Sun X. y Lin H.H. (2010). Role of plant dehydrins in antioxidation mechanisms. *Biologia* **65**, 755-759.
- Sun W.N., Bernard C., Van de Cotte B., Van Montagu M. y Verbruggen N. (2001) AtHsp17.6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance smotolerance upon overexpression. *Plant Journal* **27**, 407-415.
- Suzuki N. y Mittler R. (2006) Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiologia Plantarum* **126**, 45–51.

- Swindell W.R., Huebner M. y Weber A.P. (2007) Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BioMedCentral Genomics* **8**, 1-15.
- Swire-Clark G.A. y Marcotte W.R. Jr (1999) The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Molecular Biology* **39**, 117–128.
- Thomashow M.F. (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 571-599.
- Tompa P. (2003) The functional benefits of protein disorder. *Journal of Molecular Structure* **666-667**, 361-371.
- Torres-Schumann S., Godoy J.A. y Pintor-Toro J.A. (1992) A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Molecular Biology* **18**, 749–757.
- Tunnacliffe A., Lapinski J. y McGee B. (2005) A putative LEA protein, but no trehalose, is present in anhydrobiotic bdelloid rotifers. *Hydrobiologia* **546**, 315–321.
- Ukaji N., Kuwabara C., Takezawa D., Arakawa K. y Fujikawa S (2001) Cold acclimation-induced WAP27 localized in endoplasmic reticulum in cortical parenchyma cells of mulberry tree was homologous to group 3 late-embryogenesis abundant proteins. *Plant Physiology* **126**, 1588–1597.

- Vega-Villasante, F., Nolasco H., Montaña C., Romero-Schmidt H. y Vega-Villasante E. (1996). Efecto de la temperatura, acidez, iluminación, salinidad, irradiación solar y humedad sobre la germinación de semillas de *Pachycereus pecten-aboriginum* "cardón barbón" (Cactaceae). *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* **41**, 51-60.
- Vignols F., Wigger M., Garcia-Garrido J.M., Grekktet F., Kader J.C. y Delseny M. (1997) Rice lipid transfer protein (LTP) genes belong to a complex multigene family and are differentially regulated. *Gene* **195**, 177–186.
- Wang W.X., Vinocur B., Shoseyov O. y Altman A. (2001) Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Horticulturae* **560**, 285-292.
- Wang W., Vinocur B. y Altman A. (2003) Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**, 1-14.
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O. y Altman A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Science* **9**, 244–252.
- Wang H.J., Hsu C.M., Guang Y.J. y Wang C.S. (2005) A lily pollen ASR protein localizes to both cytoplasm and nuclei requiring a nuclear localization signal. *Physiology Plant* **123**, 314–320.
- Wang X., Li W., Li M., y Welti R. (2006) Profiling lipid changes in plant response to low temperatures. *Physiologia Plantarum* **126**, 90-96.

- Wang W., Meng B., Chen W., Ge X., Liu S. y Yu J. (2007) A proteomic study on postdiapaused embryonic development of brine shrimp (*Artemia franciscana*). *Proteomics* **7**, 3580–3591.
- White P.J. y Broadley M.R. (2003) Calcium in plants. *Annals of Botany* **92**, 487-511.
- Weiss J. y Egea-Cortines M. (2009) Transcriptomic analysis of cold response in tomato fruits identifies dehydrin as a marker of cold stress. *Journal of Applied Genetics* **50**, 311-319.
- Xin Z. y Browse J. (2000) Cold comfort farm: the acclimation of plants to freezing temperatures. *Plant, Cell and Environment* **23**, 893-902.
- Xiong L. y Zhu J.K. (2001) Abiotic stress signal transduction in plants: Molecular and genetic perspectives. *Physiologia Plantarum* **112**, 152-66.
- Xiong L. y Zhu J.K. (2002) Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment* **25**, 131-139.
- Xiong L., Schumaker K.S. y Zhu J.K. (2002) Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* **14**, 165-183.
- Xion L. y Yang Y. (2003) Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* **15**, 745–759.
- Xu D., Duan X., Wang B., Hong B., Ho T. y Wu R. (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology* **110**, 249–257.

- Xu J., Zhang Y., Guan Z., Wei W., Han L. y Chai T. (2008a). Expression and function of two dehydrins under environmental stresses in *Brassica juncea* L. *Molecular Breeding* **21**, 431-438.
- Xu J., Zhang Y.X., Wei W., Han L., Guan Z.Q., Wang Z. y Chai T.Y. (2008b) *BjDHNs confer heavy-metal tolerance in plants. Molecular Biotechnology* **38**, 91-98.
- Yeats T.H. y Rose J.K.C. (2008) The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Science* **17**, 191-198.
- Yu J.N., Zhang J.S., Shan L. y Chen S.Y. (2005) Two new group 3 LEA genes of wheat and their functional analysis in yeast. *Journal of Integrative Plant Biology* **47**, 1372–1381.
- Zapata, P.J., Serrano M., Pretel M.T., Amorós A. y Botella M.A. (2004) Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. *Plant Science* **167**, 781-788.
- Zeid, I.M. y Shedeed Z.A. (2006) Response of alfalfa to putrescine treatment under drought stress. *Biologia Plantarum* **50**, 635-640.
- Zhang y col (1993) Nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a dehydrin-like protein from *Stellaria longipes*. *Plant Physiology* **103**, 1029-1030.
- Zhang X.H., Moloney M.M. y Chinnappa C.C. (1996) Analysis of an ABA and osmotic-inducible dehydrin from *Stellaria longipes*. *Journal of Plant Physiology* **149**, 617-622.

- Zhang L., Ohta A., Takagi M. y Imai R. (2000) Expression of plant group 2 and group 3 lea genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins. *Journal Biochemical* (Tokyo) **127**, 611–616.
- Zhang Y., RoufMian M.A., Chekhovskiy K., So S., Kupfer D., Lai H. y Roe B.A (2005) Differential gene expression in *Festuca* under heat stress conditions. *Journal of Experimental Botany* **56**, 897-907.
- Zhang Y., Li J., Yu F., Cong L., Wang L., Burkard G. y Chai T. (2006) Cloning and expression analysis of SKn-type dehydrin gene from bean in response to heavy metals. *Molecular Biotechnology* **32**, 205-218.
- Zhang Y., Wang Z., Chai T., Wen Z. y Zhang H. (2008) Indian Mustard Aquaporin improves drought and heavy-metal resistance in tobacco. *Molecular Biotechnology* **40**, 280-292.
- Zhu J.K. (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 247-273.