

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“Caracterización molecular y funcional de genes que
codifican proteínas de choque térmico (OpsHSP18,
AtDjA2 y AtDjA3) de plantas bajo estrés abiótico”**

Tesis que presenta

M. en C. Silvia Salas Muñoz

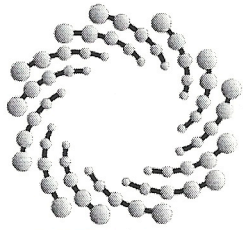
Para obtener el grado de

Doctora en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

San Luis Potosí, S.L.P., Febrero 2014



IPICYT

Constancia de aprobación de la tesis

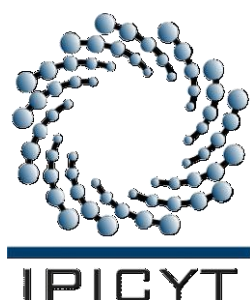
La tesis **Caracterización molecular y funcional de genes que codifican proteínas de choque térmico (OpsHSP18, AtDjA2 y AtDjA3) de plantas bajo estrés abiótico**, presentada para obtener el Grado de Doctor(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Silvia Salas Muñoz** y aprobada el **10 de Febrero de 2014** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de División la de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

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

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
(Miembro del Comité Tutoral)

Dr. Carlos Barajas López
(Miembro del Comité Tutoral)

Dra. Ruth Elena Soria Guerra
(Miembro del Comité Tutoral)

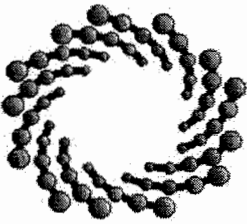


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de hongos y de 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**.

El desarrollo de esta tesis fue financiada por el Proyecto Fondos Sectoriales de Ciencia Básica **No. 103106**. “Análisis Molecular de Genes de Nopal Implicados en Estrés y su Caracterización Funcional en *Arabidopsis*”

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**No. 223329**) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.



IPICYT

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 072 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias en Biología Molecular esta asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 12 días del mes de julio del año 2010, se reunió a las 17:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro	Presidenta	IPICYT
Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont	Secretario	IPICYT
Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler	Sinodal	IPICYT

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

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

sustenta la C.

Silvia Salas Muñoz

sobre la Tesis intitulada:

Caracterización Molecular y Funcional de Genes que Codifican para Proteínas de Choque Térmico de Plantas Bajo Condiciones de Estrés Abiótico

que se desarrolló bajo la dirección de

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

El Jurado, después de deliberar, determino

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 19:45 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 12 días del mes de julio de 2010.

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

Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico



DEDICATORIAS

- A Dios** Por permitirme existir
- A mis padres** Dr. Miguel Ángel Salas Luévano y Lic. Silvia Muñoz Delgado, quienes con su comprensión, su paciencia y su apoyo incondicional en estos momentos difíciles, he logrado mi superación profesional y personal, para ellos todo mi amor eterno, mi respeto y mi admiración.
- A mi esposo** Dr. Jorge Armando Mauricio Castillo, por su amor incondicional y que me ha apoyado en todo momento para mi realización profesional y personal y por ser parte fundamental de mi vida.
- A mis hermanas** Karina y Paloma que son parte fundamental en mi vida, gracias por su apoyo, su amor y su amistad.
- A mis sobrinos** Luis Ángel, Karina Fernanda y Barbará, quienes son mi adoración y mi fuerza para seguir adelante, y a quienes amo.
- A la familia** Muñoz Delgado por su apoyo y comprensión, y a la familia Salas Luévano y Mauricio Castillo.
- A mis amigos** Nancy G., José Luis, Diocelina, Claudia, Ma. Auxilio, Patricia y Nancy P., por su amistad y apoyarme y estar conmigo durante casi 18 años de conocernos.
Jorge, Fátima, Luz, Azucena y Zazil, por estar a mi lado y brindarme su amistad y apoyo.
- Al Doctor** Juan Francisco Jiménez, por su apoyo, sus consejos y su paciencia para la realización de mi tesis, y por dejarme convivir con su familia.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, por el apoyo institucional y la oportunidad de hacer posible mi superación profesional.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias, con beca número de registro 223329.

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont, por permitir formar parte de su excelente grupo de trabajo, acertada dirección de tesis, compartir sus enseñanzas y experiencias, confianza, invaluable consejos y amistad brindada.

A la Dra. Irene Beatriz Cataño Navarro, Dra. Ruth Elena Soria Guerra y el Dr. Carlos Barajas López, por su valiosa asesoría y excelentes aportaciones para la composición final de mi tesis.

A la M. en C. Alicia Becerra Flora por su apoyo técnico y su amistad.

A todos los profesores investigadores de la División de Biología Molecular por sus valiosas enseñanzas.

A mis compañeros y amigos de laboratorio: Jorge Sáenz, Fátima Salazar, María de la Luz Guerrero, Azucena Ortega, Dr. Pablo Delgado y la Dra. Margarita por sus consejos, apoyo moral e intelectual, por su grata convivencia y nuestra amistad.

A mi familia, amigos y a todas aquellas personas que contribuyeron a la realización de este trabajo.

ÍNDICE

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	ix
Lista de figuras	x
Anexo	xii
Abreviaturas	xiii
Resumen	xvi
Abstract	xvii

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1 Estrés abiótico en las plantas	3
2.1.1 Respuesta de la planta al estrés abiótico	4
2.2 Control de calidad de la síntesis proteica	8
2.3 Proteínas de choque térmico (HSP)	10
2.3.1 Clasificación de las proteínas de choque térmico (HSP)	11
2.3.2 La compleja red de las HSP bajo condiciones de estrés	14
2.4 Proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSP)	16
2.4.1 Estructura y oligomerización de las sHSP	17
2.4.2 Mecanismo de acción de las chaperonas sHSP	19
2.4.3 Las sHSP de plantas: una amplia familia de proteínas	20
2.5 Proteínas co-chaperonas HSP40 o DnaJ o proteínas J	23
2.5.1 Estructura de las proteínas J	24
2.5.2 Clasificación de las proteínas J	25
2.5.3 Mecanismos de acción de las proteínas J	27
2.5.4 Localización y funcionalidad de las proteínas J	28
2.6 Genes de respuesta a estrés	29
2.7 Nopal (<i>Opuntia</i> spp.)	30

2.8 Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	32
2.9 <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
III. OBJETIVO	35
3.1 CAPÍTULO 1. OpsHSP18 de <i>Opuntia streptacantha</i>	35
3.2 CAPÍTULO 2. AtDjA2 y AtDjA3 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	36
IV. CAPITULO 1. OpsHSP18 de <i>Opuntia streptacantha</i>	37
4.1 “The <i>Opuntia streptacantha</i> OpsHSP18 Gene Confers Salt and Osmotic Stress Tolerance in <i>Arabidopsis thaliana</i> ”	39
4.2 Identificación de posibles interactores de la proteína OpsHSP18 mediante el sistema de doble híbrido “Split-ubiquitin”	61
V. CAPITULO 2. AtDjA2 y AtDjA3 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	63
5.1 Proteínas J: AtDjA3.1, AtDjA3.2 y AtDjA2	65
5.1.1 Proteína AtDjA3.2, versión que retiene el intrón de <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
5.1.1.1 El gen <i>AtDjA3</i> está involucrado en la respuesta a estrés abiótico durante la germinación	71
5.1.1.2 El gen <i>AtDjA3</i> favorece el desarrollo de cotiledones verdes bajo estrés abiótico	75
5.1.1.3 El gen <i>AtDjA3</i> está involucrado en la respuesta a estrés abiótico durante el desarrollo de plántulas	77
5.1.2 Proteína AtDjA3.1, versión que procesa el intrón de <i>Arabidopsis thaliana</i>	78
5.1.3 Proteína AtDjA2 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	80
5.1.3.1 El gen <i>AtDjA2</i> desempeña un papel importante en la tolerancia al estrés abiótico durante la germinación	81
5.1.3.2 La sobreexpresión del gen <i>AtDjA2</i> aumenta el porcentaje de cotiledones verdes bajo estrés abiótico	82
5.1.3.3 Identificación de los posibles interactores de la proteína AtDjA2 mediante el sistema de doble híbrido “Split-ubiquitin”	84
VI. Discusión	85
VII. Conclusiones	95
VIII. Anexos	97
IX. Referencias	111

LISTA DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Patrones de expresión en estrés abiótico y etapas de desarrollo de los miembros de las subfamilias de las HSP de <i>A. thaliana</i>	22
2	Lista de semillas	97
3	Lista de Microorganismos	98
4	Lista de Vectores	99
5	Lista de construcciones	101
6	Lista de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes	102

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Respuesta de la planta al estrés abiótico	7
2	Modelo simplificado del control de calidad de proteínas en condiciones normales y de estrés	9
3	Dominios presentes en cada una de las familias HSP	12
4	La red de proteínas de choque térmico (HSP) en la respuesta a estrés abiótico	15
5	Dominios de las proteínas sHSP	17
6	Estructura cristalizada de la proteína HSP16.9 de <i>Triticum aestivum</i>	18
7	Mecanismo de acción de las proteínas sHSP	20
8	Clasificación y estructura de las sHSP de plantas	21
9	Estructura de las proteínas J	25
10	Clasificación de las proteínas J	26
11	Mecanismos de acción de las proteínas J	28
12	Sistema de dos híbridos “split-ubiquitin” de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62
13	Alineamiento tipo Clustal W de la secuencia SSHPv-S38 de frijol con los proteínas J de <i>A. thaliana</i>	65
14	Esquema de la organización genómica de las proteínas J	67
15	Alineamiento tipo Clustal W de las proteínas DnaJ	68
16	Líneas mutantes y sobreexpresantes del gen <i>AtDjA3</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	69
17	Gráfica del peso de las semillas de Col-0, la línea mutante <i>AtdjA3</i> y líneas sobreexpresantes <i>35S::AtDjA3.2-8</i> , -14 y -15 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	70
18	Porcentaje de germinación de las semillas de Col-0, línea mutante <i>AtDjAj3</i> y líneas sobreexpresantes <i>35S::AtDjA3.2-8</i> , -14 y -15 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	72

19	Porcentaje de germinación de semillas de Col-0, línea mutante <i>AtDjA3</i> y líneas sobreexpresantes <i>35S::AtDjA3.2-8</i> , -14 y -15 de <i>Arabidopsis thaliana</i> bajo condiciones de estrés osmótico	73
20	Efecto de la aplicación de ABA en el porcentaje de germinación de las semillas de Col-0, línea mutante <i>AtDjA3</i> y líneas sobreexpresantes <i>35S::AtDjA3.2-8</i> , -14 y -15 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	74
21	Cotiledones verdes de Col-0, línea mutante <i>AtDjA3</i> y líneas sobreexpresantes <i>35S::AtDjA3.2-8</i> , -14 y -15 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	76
22	Crecimiento de las plántulas de Col-0, línea mutante <i>AtDjA3</i> y líneas sobreexpresantes <i>35S::AtDjA3.2-8</i> , -14 y -15 de <i>Arabidopsis thaliana</i> bajo estrés abiótico	78
23	Esquema del diseño de los oligonucleótidos y la expresión del transcrito <i>AtDjA3.1</i> en las líneas sobreexpresantes <i>35S::AtDjA3.1</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	79
24	Línea mutante y líneas sobreexpresantes del gen <i>AtDjA2</i> de <i>Arabidopsis thaliana</i>	80
25	Porcentaje de germinación de semillas de Col-0, línea mutante <i>AtDjA2</i> y líneas sobreexpresantes <i>35S::AtDjA2-3</i> , -5 y -7 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	82
26	Cotiledones verdes de Col-0, línea mutante <i>AtDjA2</i> y líneas sobreexpresantes <i>35S::AtDjA2-3</i> , -5 y -7 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	83
27	Recombinación del Sistema Gateway [®] mediante la enzima LR Clonasa [®] II	101

ANEXO

Materiales y Métodos

Página

97

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
μM	Micromolar
aa	Aminoácidos
ABA	Ácido abscísico, del inglés A bscisic a cid
ABFs	Factores de unión ABRE, del inglés ABRE B inding F actors
ABRE	Elementos de respuesta ácido abscísico, del inglés A bscisic acid R esponse E lements
ADP	Difosfato de adenosina, del inglés A denosine D i P hosphate
APX	Ascorbato peroxidasa, del inglés A scorbate P ero X idase
AQP	Acuaporinas, del inglés A qua P orins
ATP	Trifosfato de adenosina, del inglés A denosine T ri P hosphate
CAT	Catalasa, del inglés CAT alase
CDPK	Proteínas cinasas dependientes de calcio, del inglés C alcium- D ependent P rotein K inase
Col-0	Ecotipo Columbia 0 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
d	Días
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucleico, del inglés D eoxyribo N ucleic A cid
dNTP's	Trifosfatos Deoxinucleótidos del inglés D eoxy N ucleotide T ri P hosphates
DRE	Elementos de respuesta a la deshidratación, del inglés E lements of R esponse to D ehydration
EDTA	Ácido etiléndiaminotetraacético, sal disódica
F	Fenilalanina
G	Glicina
h	Hora
HSE	Elementos de choque térmico, del inglés H eat S hock E lements
HSP	Proteínas de choque térmico, del inglés H eat S hock P roteins
JLP	Proteínas tipo J, del inglés J Like P roteins

Kb	Kilo bases
kDa	Kilo Dalton
LB	Borde izquierdo, del inglés L eft B order
LB	Medio Luria Bertani
LEA	Abundantes en embriogénesis tardía, del inglés L ate E mbryogenesis A bundant
MgCl₂	Cloruro de magnesio
min	Minutos
ml	Militro
mM	Milimolar
MS	Medio Murashige y Skoog
NaCl	Cloruro de sodio
NBD	Dominio de unión a nucleótido, del inglés N ucleotide B inding D omain
NEF	Factor de cambio de nucleótido, del inglés N ucleotide E xchange F actor
ng	Nanogramo
OD	Densidad óptica, del inglés O ptical D ensity
ORFs	Marco de lectura abierto del inglés O pen R eadng F rame
P	Plastidios
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés P olymerase C hain R eaction
PQC	Control de calidad de las proteínas, del inglés P rotein Q uality C ontrol
RB	Borde derecho, del inglés R ight B order
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Ácido ribonucleico, del inglés R ibo N ucleic A cid
ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés R eactive O xxygen S pecies
rpm	Revoluciones por minuto

RT-PCR	Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa, el inglés R everse T ranscription P olymerase C hain R eaction
s	Segundos
SA	Ácido salicílico, del inglés S alicylic A cid
sHSP	Proteínas de choque térmico de bajo peso molecular, del inglés s mall H eat S hock P roteins
SOD	Superóxido dismutasa, del inglés S uper O xide D ismutases
SOS	Muy sensible a la sal, del inglés S alt O verly S ensitive
SSHs	Hibridación sustractiva por supresión, del inglés S uppression S ubtractive H ybridization
TAE	Tris, Acetato y EDTA
UTR	Región no traducida, del inglés U n T ranslated R egion
µg	Microgramos
µl	Microlitros

RESUMEN

“Caracterización molecular y funcional de genes que codifican proteínas de choque térmico (OpsHSP18, AtDjA2 y AtDjA3) de plantas bajo estrés abiótico”

El estrés abiótico es la principal causa de pérdidas de cultivos en el mundo. Sin embargo, las plantas han desarrollado mecanismos que les permiten detectar, responder y tolerar a múltiples estreses. Uno de los principales mecanismos de tolerancia al estrés en plantas, es la síntesis de proteínas de choque térmico (HSP). En este trabajo se llevó a cabo la caracterización funcional del gen *OpsHSP18* de nopal (*Opuntia streptacantha*) que codifica una HSP de bajo peso molecular (sHSP), el cual se aisló de una biblioteca de cDNA de nopal. Líneas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan el gen *OpsHSP18* mostraron un mayor porcentaje de germinación bajo estrés salino (NaCl) y osmótico (glucosa y manitol) y bajo la aplicación de ABA, en comparación con la WT (Col-0). Asimismo, en ensayos de tolerancia al estrés por la aplicación de NaCl o glucosa, las líneas *35S::OpsHSP18*, mostraron un aumento en el porcentaje de supervivencia con respecto a Col-0. Por otro lado, en esta tesis nos enfocamos a estudiar los genes *AtDjA2* y *AtDjA3* de *Arabidopsis* que codifican para proteínas J (HSP40). Para su caracterización se obtuvieron líneas mutantes de T-DNA y se generaron líneas sobreexpresantes para ambos genes. Respecto al gen *AtDjA3*, se han reportado dos transcritos: el *AtDjA3.1* (343 aa) y *AtDjA3.2* (420 aa). La línea mutante del gen *AtDjA3* mostró un fenotipo de sensibilidad a estrés salino, osmótico y tratamientos de ABA, mientras que las líneas que sobreexpresan la versión *AtDjA3.2*, mostraron una mayor tasa de germinación, mayor desarrollo de los cotiledones y peso fresco de las plántulas sometidas a estrés. También generamos líneas sobreexpresantes de la versión *AtDjA3.1* de *Arabidopsis*, para su posterior análisis. En lo que respecta al gen *AtDjA2*, la línea mutante (*j2*) mostró un retraso en la germinación bajo los tratamientos de glucosa y ABA, caso contrario a lo observado en las líneas transgénicas. Este comportamiento fue también observado en el desarrollo de los cotiledones bajo la aplicación de NaCl y glucosa. Por último, con la finalidad de identificar proteínas blanco y/o interactores de las proteínas HSP, se construyeron vectores anzuelo para levadura *pDHB1/OpsHSP18* y *pDHB1/AtDjA2*, que se utilizarán en el sistema de dos híbridos “Split ubiquitin”. Los resultados indican que ambas chaperonas de la familia HSP están involucradas en la respuesta al estrés abiótico, y una posible relación de las proteínas HSP con la ruta de señalización de ABA, sugiriendo que podrían estar participando en la protección de proteínas cuando la planta está sujeta a condiciones desfavorables durante su crecimiento y desarrollo.

Palabras claves: *Arabidopsis thaliana*, estrés abiótico, HSP, proteínas J y OpsHSP18.

ABSTRACT

"Molecular and functional characterization of genes encoding heat shock proteins (OpSHSP18, AtDJA2, and AtDJA3) of plants under abiotic stress"

Abiotic stress is the main cause of crop loss worldwide. However, plants have developed mechanisms that allow them to detect, respond to and tolerate multiple stresses. It has been reported that in plants the synthesis of heat shock proteins (HSP) is one of the main mechanisms of stress tolerance. In this work was performed the functional characterization of *OpSHSP18* gene of cactus (*Opuntia streptacantha*) encoding a low molecular weight HSP (sHSP). This gene was isolated from a cactus cDNA library under abiotic stress. *A. thaliana* 35S::*OpSHSP18* over-expressing lines showed a higher germination percentage under ABA application, salt (NaCl), and osmotic (glucose and mannitol) stress, compared to the WT (Col-0). Also, was observed an increase in the survival rate of over-expressing plants during the application of NaCl and glucose. Moreover, from a subtractive library (SHS) of bean (*Phaseolus vulgaris*) under salt stress it was isolated the unigen SSHPv-S38, which encodes the protein J (HSP40). In order to characterize the *AtDJA3* and *AtDJA2* orthologous genes from *A. thaliana*, we obtained over-expressing and T-DNA lines of these genes. It is known that *AtDJA3* gene produce two transcript: *AtDJA3.1* (343 aa) and *AtDJA3.2* (420 aa). It was observed a sensitive phenotype during abiotic stress in mutant plants of the *AtDJA3* gene in compared to Col-0. The 35S::*AtDJA3.2* over-expressing lines showed a tolerance under salt and osmotic stress, and ABA application. The tolerance phenotype was measured by the increase of germination percentage, cotyledons development and fresh weight of seedlings. To date, we have over-expressing lines of the version *AtDJA3.1* from *Arabidopsis*, this line will be analyzed under abiotic stress. Regarding *AtDJA2* gene, it was observed a delay in germination percentage under glucose or ABA application in the mutant line of the *AtDJA2* gene, whereas, an increase in germination percentage was observed in transgenic lines. Additionally, in the 35S::*AtDJA2* transgenic lines, a higher percentage of green cotyledons development was observed under application of NaCl and glucose. In order to identify possible interactors of HSP proteins, we generate bait vectors *pDHB1/AtDJA2* and *pDHB1/OpSHSP18*, for the "Split ubiquitin" two-hybrid system in *Saccharomyces cerevisiae*. From the results obtained during this study, both molecular chaperones of the HSP family are involved in the response abiotic stress; and hormone ABA. In this sense, these chaperones could be involved in the protection of proteins when the plants are subject to unfavorable conditions during growth and development.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, abiotic stress, HSP, J proteins and OpSHSP18.

I. INTRODUCCIÓN

Las actividades antropogénicas tienen un gran impacto sobre la vida en la tierra, las cuales están provocando alteraciones en el clima y una contaminación ambiental importante. Algunos de los factores que se ven afectados como consecuencia del cambio climático son: el aumento en la demanda de alimentos, la disminución del rendimiento en las regiones productoras, la vulnerabilidad en la producción agrícola, la contaminación del suelo, del agua y del medio ambiente (Khanna-Chopra y Sinha, 1998).

Las variaciones en el medio ambiente afectan de manera importante a la agricultura, debido a que las plantas son organismos sésiles no pueden escapar de los factores de estrés, tales como la sequía salinidad, temperaturas extremas e inundaciones (Wang y col., 2003). Sin embargo, han desarrollado múltiples mecanismos que les permiten tolerar y responder a diversas condiciones ambientales desfavorables (Rao, 2006).

Una gran variedad de cultivares que presentan tolerancia al estrés, están siendo estudiadas para conocer y entender los mecanismos moleculares que presentan dichas plantas bajo condiciones desfavorables. Un primer acercamiento es la identificación y el aislamiento de genes que se expresan diferencialmente bajo de estrés abiótico. Nuestro grupo de investigación ha construido diversas bibliotecas de cDNA y sustractivas (SSHs) tanto de nopal (*Opuntia* spp.) como de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo estrés abiótico. En dichas bibliotecas, se ha identificado una serie de genes que son interesantes para su caracterización funcional, los cuales están implicados en respuesta al estrés (Hernández-Lucero y col., 2008; 2013; Ochoa-Alfaro y col., 2012).

Actualmente, se ha utilizado *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio de la biología molecular de planta, debido a que cuenta con una amplia variedad de herramientas para la caracterización de genes de interés. Con todo lo anterior es

evidente la necesidad de estudiar la respuesta de las plantas y su adaptación al estrés abiótico, con la finalidad de obtener cultivos más resistentes a través de la biotecnología vegetal.

II. ANTECEDENTES

2.1 Estrés abiótico en las plantas

La agricultura es una de las principales actividades que se ven afectadas por la contaminación, y actualmente por el cambio climático que está sufriendo el planeta. Además, la producción agrícola es una de las actividades que demanda mayor cantidad de agua en muchas regiones del planeta, por lo que la sequía es uno de los principales obstáculos para la producción de alimentos a nivel mundial. En México, la escasa precipitación, principalmente en el centro-norte del país, limita fuertemente la productividad afectando principalmente a los cultivos de interés comercial (Aguado-Santacruz y García-Moya, 1998). Además, otro factor de estrés es la salinidad que presenta en suelo y en el agua, el cual es un problema que ha ido creciendo en los últimos años. La salinidad afecta el crecimiento y desarrollo de la planta y la productividad causando la pérdida de cultivos completos. La mayoría de los cultivos de interés comercial son sensibles a bajas concentraciones de sal (Zhu, 2001). Actualmente, las temperaturas extremas son uno de los principales factores que afectan la distribución y el rendimiento de los cultivos, siendo que la mayoría de los cultivos están expuestos a estrés por calor y frío durante su ciclo de vida principalmente en regiones semiáridas y áridas (Stone, 2001).

De manera que el estrés abiótico causado por la sequía, la salinidad y las temperaturas extremas, son graves amenazas para la agricultura, y asimismo para el medio ambiente. El estrés abiótico es la principal causa de pérdida de cultivos en el mundo, reduciendo más del 50% el rendimiento promedio de los principales cultivos (Bray y col., 2000, Wang y col., 2007), provocando una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y moleculares que afectan el crecimiento, el desarrollo y la productividad de las plantas (Wang y col., 2001).

2.1.1 Respuesta de la planta al estrés abiótico

Las plantas están expuestas a diferentes tipos de estreses al mismo tiempo o bien separados temporalmente y en ambos casos deben presentar una respuesta integrada. Las respuestas de la planta varían dependiendo del tipo y duración del estrés al que está sometida la planta, por lo que existen cambios anatómicos, fisiológicos y moleculares, los cuales llevan a la tolerancia o a la resistencia de la planta al estrés o bien en un caso extremo, en el cual los mecanismos que tiene la planta no le permiten responder eficientemente contra el estrés, se provoca un daño celular irreversible, que posteriormente ocasiona la muerte (Wahid y col., 2007). Además, su tolerancia al estrés varía porque difieren en sus capacidades de percepción, de señalización y de respuesta al estrés.

Asimismo, las rutas de señalización a diferentes tipos de estrés comparten factores que convergen para una respuesta en común y en algunas ocasiones potenciar esa respuesta (cross-talk; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Knight y Knight, 2001). Por ejemplo, la sequía ó la salinidad, primero se manifiestan como estrés osmótico (Zhu, 2001); y el estrés por calor, sequía ó salino, se manifiesta como estrés oxidativo (Smirnov, 1998). Por lo tanto, los tipos de estreses primarios son la sequía, la salinidad, el calor y el frío, causando daños celulares y a la vez provocan otros tipos de estrés secundarios tales como el estrés osmótico y el oxidativo (Fig. 1).

Las primeras señales de estrés que se han sugerido, son la alteración de la homeostasis osmótica y iónica, en lo que respecta al estrés por sequía, salinidad y frío (Wang y col., 2003) y los cambios en la fluidez de la membrana, el daño funcional y estructural de proteínas causado por calor y frío (Wahid y col., 2007). Por lo que estas señales desencadenan procesos de percepción y de transducción de estas señales, tales como la síntesis de osmosensores, segundos mensajeros (Ca^{2+} , ROS), MAP cinasas, sensores de Ca^{2+} (SOS3) y proteínas cinasas dependientes de calcio (CDPKs; Wang y col., 2003). El resultado de las cascadas

de señalización, implican la modificación y el control de la expresión de factores de transcripción que activan un amplio conjunto de genes (Sung y col., 2003), tales como los factores de transcripción por choque térmico (HSF) que se unen a elementos regulatorios localizados en los promotores de los genes que codifican proteínas de choque térmico (HSP), referidos como elementos de choque térmico (HSE; Schoffl y col., 1998); factores unión a elementos de respuesta a deshidratación (DREB) que activan la expresión de genes que contienen elementos de respuesta a deshidratación (DRE), involucrados en la tolerancia de la planta al estrés por sequía, salinidad y frío (Liu y col., 2000); factores de transcripción que se unen a elementos de respuesta a ácido abscísico (ABRE), los cuales se denominan ABF (Factores de unión ABRE; Choi y col., 2000; Fig. 1).

El control transcripcional activa mecanismos de respuesta para restablecer la homeostasis, proteger y reparar el daño de proteínas y membranas (Wang y col., 2003). Dichos mecanismos de respuesta incluyen la expresión de proteínas de detoxificación, tales como la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX), la catalasa (CAT), entre otras (Mittler y col., 2004) ya que cuando la planta está expuesta a condiciones desfavorables como a temperaturas extremas, sequía ó salinidad puede incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Aunque estas ROS juegan un papel importante en señalización, elongación celular, entre otros, también pueden causar daño a proteínas, lípidos, DNA y otras importantes macromoléculas, afectando inevitablemente el metabolismo de las plantas y limitando su crecimiento (Sairam y Tyagi, 2004). Otra de las respuestas es la acumulación de osmoprotectores (osmolitos compatibles) como son azúcares, prolina, glicina-betaína, lo que sugiere que estos osmolitos compatibles contribuyen a la tolerancia al estrés (Sairam y Tyagi, 2004). Aunado a lo anterior, también se ha reportado la expresión de las acuaporinas (AQP), las cuales son proteínas transmembranales encargadas de transportar el agua a través de los compartimentos celulares, y por lo tanto, desempeñan un papel dinámico en el mantenimiento de la homeostasis celular (Fig. 1; Estrella y col., 2004).

Otros dos grupos importantes de proteínas inducidas por el estrés son las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA) y las proteínas de choque térmico (HSP). En el caso de las proteínas LEA, se ha sugerido que tienen una actividad tipo chaperona, y también, actúan como moléculas de unión al agua, en el secuestro de iones, en la estabilización de macromoléculas y de membranas (Thomashow, 1999). Las HSP actúan como chaperonas moleculares, las cuales participan en diferentes procesos como son: 1) el plegamiento y replegamiento de proteínas desplegadas; 2) mantienen la conformación funcional y estructural de las proteínas; 3) previenen su agregación tanto en condiciones sin estrés como de estrés; 4) participan en la estabilización y protección de las membranas (Fig. 1; Vierling, 1991; Waters y col., 1996).

Una respuesta inadecuada en uno o varios pasos de las rutas de señalización ó en la activación de genes puede resultar en cambios irreversibles en la homeostasis celular, y en la estructura y función de proteínas y de membranas, provocando la muerte celular (Wang y col., 2003).

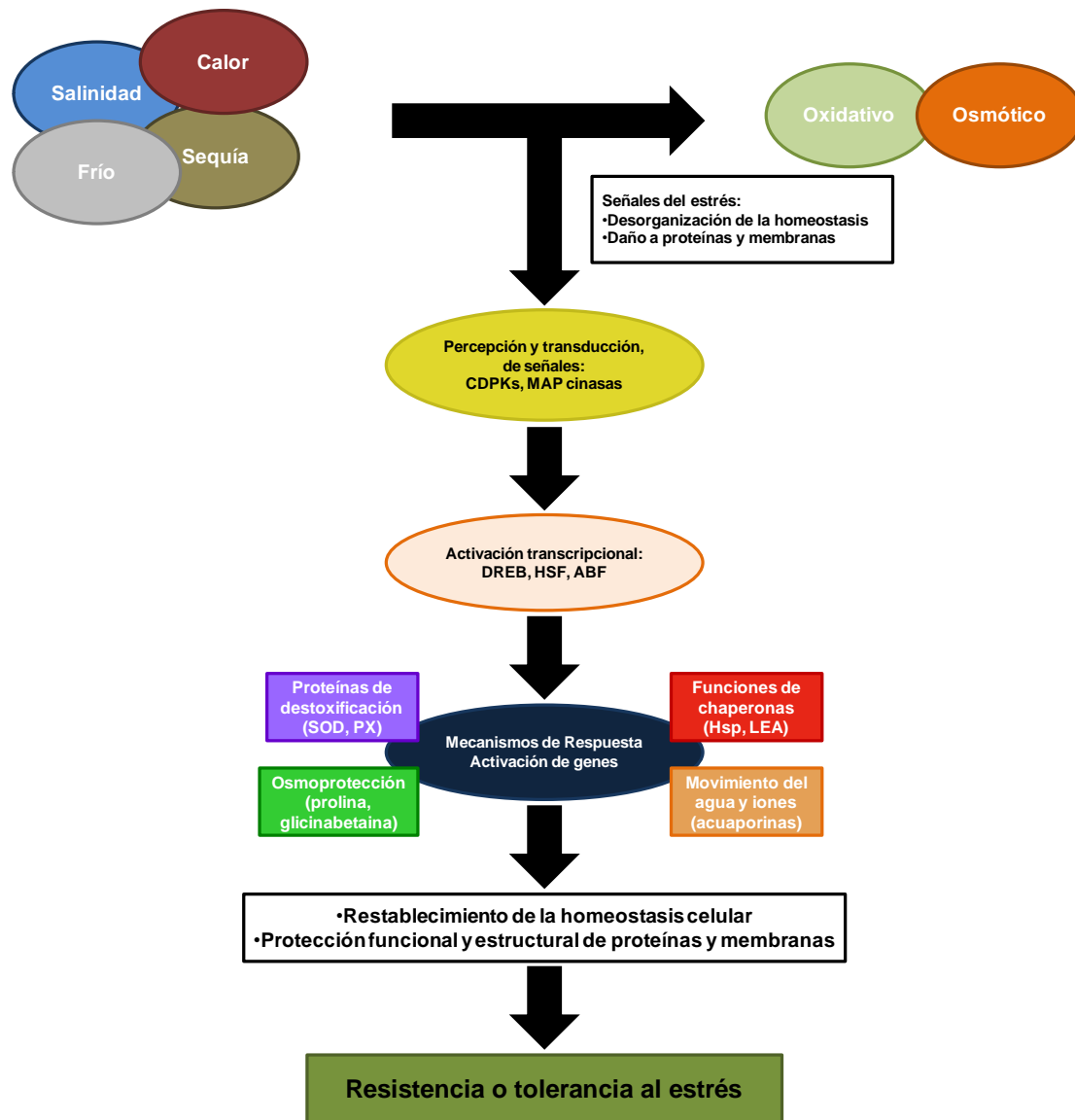


Figura 1. Respuesta de la planta al estrés abiótico. Las condiciones de estrés abiótico son: sequía, salinidad, calor, frío, oxidativo y osmótico. Las primeras señales del estrés abiótico son: la alteración de la homeostasis celular, el daño de membranas y proteínas funcionales, las cuales desencadenan procesos de señalización y de control transcripcional, activando mecanismos de respuesta para la tolerancia o resistencia al estrés. Una respuesta inadecuada puede causar cambios irreversibles en la homeostasis celular, y en la función de las proteínas y membranas causando la muerte celular. Esta imagen se adaptó de Sung y col., 2003.

2.2 Control de calidad de la síntesis proteica

Uno de los principales mecanismos para la tolerancia al estrés abiótico es la síntesis de proteínas estructurales y funcionales, y esto se lleva a cabo mediante el proceso de control de calidad de las proteínas (PQC) en la célula. El PQC, es un proceso bioquímico importante que contribuye en la homeostasis de las proteínas celulares y en el mantenimiento de las funciones celulares tanto en condiciones normales como de estrés. En general, PQC comprende múltiples reacciones bioquímicas complejas que contribuyen a la integridad funcional de proteínas, que van desde el plegamiento, replegamiento, ensamble, así como evitar la agregación y degradación proteolítica de polipéptidos dañados (Wickner y col., 1999).

Estos procesos son importantes para el crecimiento celular en condiciones normales y de estrés (Fig. 2). En condiciones sin estrés, la mayoría de las proteínas celulares sintetizadas *de novo* no requieren la asistencia de chaperonas moleculares, y esto debido a la estabilidad de sus estructuras, estabilización por ligandos o interacciones con proteínas u otras moléculas (Fig. 2A; Wickner y col., 1999). Sin embargo, cerca del 10 al 20% de los polipéptidos sintetizados están asociados con chaperonas, las cuales están implicadas en la ruta del plegamiento inicial (Wickner y col., 1999; Narberhaus, 2002; Hartl y Hayer-Hartl, 2002). Además los polipéptidos dañados que resultan de los errores en la transcripción y/o traducción, son degradados por el proteosoma en las células eucariotas (Narberhaus, 2002).

En condiciones de estrés, hay un incremento en el número de polipéptidos inactivos, desnaturalizados o dañados, que hacen que el PQC sea esencial para la supervivencia de la célula (Fig. 2B; Leidholda y Voos, 2007). De esta manera, la síntesis y la participación de las chaperonas moleculares se incrementan, con la finalidad de establecer la homeostasis celular.

Por lo tanto, las células han desarrollado una maquinaria proteica, que consiste de chaperonas moleculares y proteasas que catalizan diversas reacciones para mantener el control de calidad de las proteínas (PQC; Leidholda y Voos, 2007). El PQC, integra dos sistemas, uno de ellos es el sistema de chaperonas moleculares, que su función es participar en el plegamiento de proteínas que se encuentran mal plegadas. Por otro lado, si este falla, las proteínas o polipéptidos dañados se transfieren al segundo sistema de degradación vía el proteosoma (Narberhaus, 2002; Leidholda y Voos, 2007). Las chaperonas moleculares son de particular importancia en la tolerancia de la planta, y una de las principales familias de chaperonas moleculares son las proteínas de choque térmico (HSP).

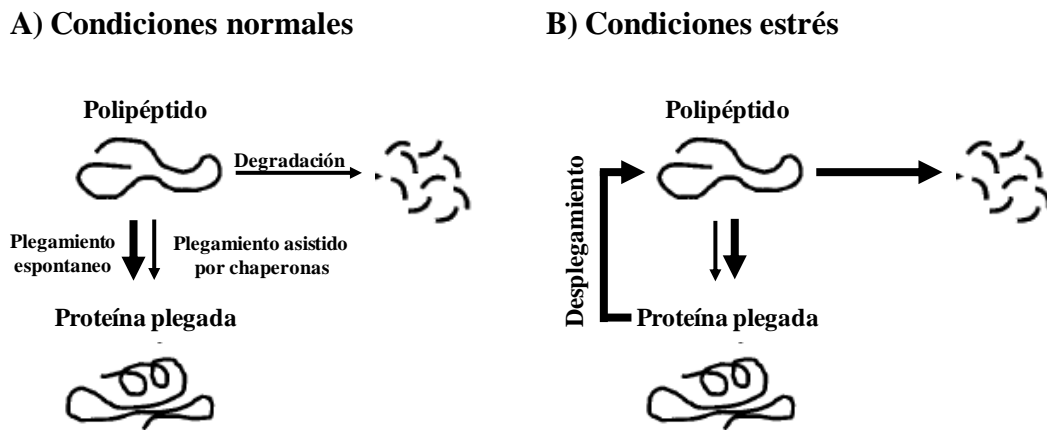


Figura 2. Modelo simplificado del control de calidad de proteínas en condiciones normales y de estrés. En condiciones normales, el plegamiento espontáneo de polipéptidos sin la asistencia de chaperonas moleculares es muy alto (flecha vertical gruesa) y el plegamiento de polipéptidos asistido por chaperonas es muy bajo, al igual que la degradación de estos (flecha horizontal delgada). En condiciones de estrés (ej. calor), el desplegamiento de proteínas plegadas es alto, y se requiere del sistema de control de calidad dependiente de chaperonas para el replegamiento. Las proteínas desplegadas son degradadas por el proteosoma. Esta imagen se adaptó de Narberhaus, 2002.

2.3 Proteínas de choque térmico (HSP)

La expresión de las chaperonas moleculares es una adaptación importante que contribuye a la homeostasis celular, tanto en condiciones óptimas como en condiciones adversas de crecimiento. La mayoría de las chaperonas moleculares son solubles en agua y por lo tanto contribuyen a la tolerancia al estrés, a través de la hidratación de las estructuras celulares (Wahid y Close, 2007). Las chaperonas moleculares son conocidas también como proteínas de choque térmico (HSP).

Las HSP se definen como una familia de proteínas, las cuales participan en el correcto plegamiento de otros polipéptidos, y en algunos casos su ensamble dentro de estructuras oligoméricas. Además participan regulando la activación y función de las proteínas blanco, aunque no son componentes de ellas (Ellis, 1990; Xue y col., 2010). Esta definición implica que la función predominante de las HSP es interactuar transitoriamente con otras proteínas, evitando de este modo la formación de interacciones no deseadas, que podrían conducir a la formación de agregados proteicos (Fink, 1999; Narberhaus, 2002).

Las HSP son proteínas que se encuentran muy conservadas en la historia evolutiva de todos los seres vivos, puesto que aparecen con función y estructura muy similar en bacterias, levaduras, plantas, animales y humanos (Hirt y Shinozaki, 2003). Se ha descrito que las HSP de plantas no solamente se inducen en condiciones de calor, sino que también se inducen a bajas temperaturas, salinidad, estrés osmótico, estrés oxidativo, sequía, heridas, exposición a luz intensa y a metales pesados (Vierling, 1991; Boston, 1996; Sun y col., 2001; Rossel y col., 2002; Liu y col., 2006; Swindell y col., 2007). También se han reportado que se expresan durante diversas etapas de desarrollo, incluyendo la maduración del polen, embriogénesis, maduración de la semilla y establecimiento de plántulas y floración (zur Nieden y col., 1995; Waters y col., 1996; Wehmeyer y Vierling, 2000; Shen y col., 2011; Zhou y col., 2012). El fenómeno que ha sido

mejor caracterizado es el desarrollo de la semilla (Coca y col., 1994; DeRocher y Vierling, 1994; Wehmeyer y col., 1996).

A nivel molecular las HSP están involucradas en una variedad de procesos moleculares, tales como la síntesis, plegamiento y degradación de proteínas, ensamble de complejos oligoméricos, transporte de proteínas a través de la membrana, estabilización de cadenas polipeptídicas y membranas, y la prevención de la inactivación de proteínas (Vierling, 1991; Wang y col., 2004; Xue y col., 2010).

2.3.1 Clasificación de las proteínas de choque térmico (HSP)

Las HSP comprenden varias familias de proteínas conservadas evolutivamente, las cuales han sido designadas de acuerdo a su peso molecular, su homología de la secuencia de aminoácidos (aa), sus funciones y dominios, como HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, y HSP de bajo peso molecular (sHSP; Bukau y Horwich, 1998; Wang y col., 2004; Gupta y col., 2010); cada una de las familias de las HSP presentan dominios característicos (Fig. 3). La organización de los dominios de la familia HSP100 son: un dominio amino terminal (N-terminal; DN), seguido de un dominio de unión a nucleótido (NBD-1), un dominio central (DM), después un segundo dominio de unión a nucleótido (NBD-2) y por último un dominio carboxilo terminal (C-terminal, DC; Lee y col., 2003; Tkach y Glover, 2004; Doyle y Wickner, 2008). Ambos dominios NBDs se unen e hidrolizan el ATP, el DM es esencial para la actividad remodeladora, y el DN es importante para la interacción con el sustrato específico (Doyle y Wickner, 2008; Fig. 3). Las HSP90 están compuestas por tres dominios: el dominio ATPasa en el N-terminal (ND), dominio central (MD) importante para la unión del sustrato y dominio de dimerización en C-terminal (CD; Pearl y Prodromou, 2006; Fig. 3). La familia de la HSP70, consiste de un dominio ATPasa en el N-terminal, un dominio de unión al sustrato y en el C-terminal de función desconocida (Mayer y Bukau, 2005; Fig. 3). Los dominios presentes en la familia HSP60 (chaperoninas) son: el dominio apical, cuya su función es la unión

al sustrato, el dominio ecuatorial en donde se encuentra el sitio de unión ATP y el dominio intermediario, el cual es el que permite la rotación de los otros dos dominios para el plegamiento de la proteína (Bukau y Horwich, 1998; Fig. 3). Por último, la familia de las sHSP, presentan una región N-terminal como sitio de especificidad para la unión al sustrato, un dominio α -cristalino como responsable de la unión al sustrato, y la región C-terminal como sitio de contacto de la estructura oligomérica (Scharf y col., 2001; Jaya y col., 2009; Fig. 3).

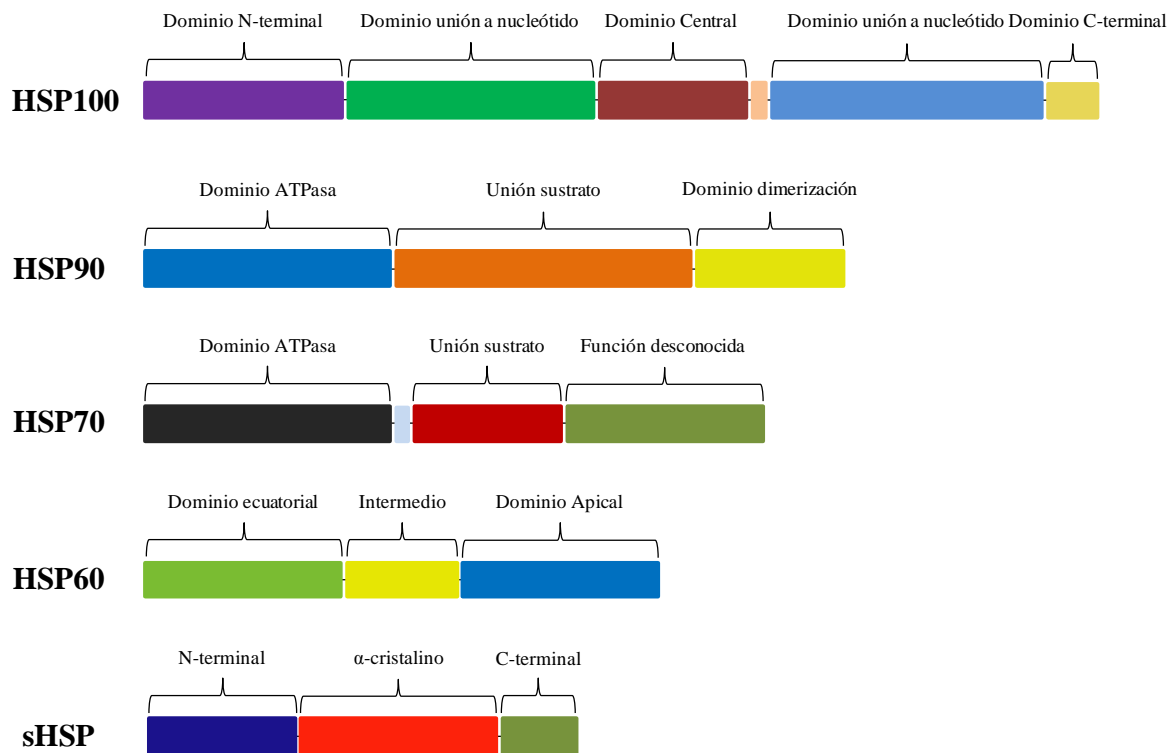


Figura 3. Dominios presentes en cada una de las familias HSP. La familia HSP100 presenta los dominios: Dominio N-terminal, unión a nucleótido, central y C-terminal. La familia HSP90 presenta los dominios ATPasa, unión al sustrato y dimerización. La familia HSP70 presenta los dominios ATPasa, unión al sustrato y de función desconocida. La familia HSP60 presenta los dominios ecuatorial, intermedio y el apical. La familia sHSP presenta la región N- y -C-terminal y el dominio α -cristalino.

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se han identificado 58 genes que codifican para las HSP, de las cuales 8 pertenecen a HSP100, 7 a HSP90, 18 a HSP70, 7 a HSP60 y 19 a sHSP (Agarwal y col., 2001; Wang y col., 2004; Mayer y Bukau,

2005; Kadota y Shirasu, 2012; Waters, 2013). Aunque las HSP son estructuralmente diversas, comparten una característica común que es su capacidad de interactuar con otras proteínas, las cuales se encuentran mal plegadas o con una estructura no definida, y así facilitar muchos procesos celulares básicos, incluyendo plegamiento, localización y degradación de proteínas, entre otras (Garrett y Vierling, 2000).

HSP100: Son miembros de la superfamilia AAA+ de las ATPasas, algunas de sus funciones son prevenir la agregación y solubilizar los agregados de proteínas, entre otras (Wang y col., 2004; Doyle y Wickner, 2008). El mecanismo para el rescate de las proteínas agregadas, implica la cooperación del sistema de la chaperona HSP70, el cual consiste en que las HSP100 resolubilizan las proteínas agregadas y las liberan en un estado competente para ser replegadas por el sistema HSP70 y co-chaperonas (Zietkiewicz y col., 2004; Wang y col., 2004). Las HSP100 han sido localizadas en citoplasma, cloroplasto, mitocondria (Wang y col., 2004).

HSP90: Proteínas altamente conservadas involucradas en el ensamble, maduración, estabilización y activación de proteínas de señalización, tales como las cinasas, receptores de hormona y factores de transcripción (Pearl y Prodromou, 2006). En *Arabidopsis*, las HSP90 se encuentran en diferentes compartimentos, tales como el citoplasma, cloroplasto, mitocondria y retículo endoplásmico (Krishna y Gloor, 2001). Otra de las funciones de las HSP90 es regular negativamente a los factores de transcripción de estrés por calor (HSF) durante el crecimiento, y al unirse a los HSF, los mantienen en un estado inactivo (Hahn y col., 2011).

HSP70: Esta familia de proteínas asisten a un amplio rango de procesos, tales como plegamiento, ensamble de proteínas plegadas, replegamiento de proteínas desplegadas en condiciones normales y de estrés, prevenir la agregación de proteínas, facilitar la degradación de proteínas inestables, regulación

transcripcional bajo condiciones de estrés y procesos de importe y translocación de proteínas (Hartl y Hayer-Hartl, 2002; Young y col., 2003; Mayer y Bukau, 2005). Estas proteínas, se encuentran ampliamente distribuidas en la célula, como en el citoplasma, cloroplasto, mitocondria, retículo endoplasmático y núcleo (Hendrick y Hartl, 1993; Wang y col., 2004). El sistema de plegamiento de la HSP70, está regulado por dos co-chaperonas que son la HSP40 (DnaJ) y el factor de cambio de nucleótido (NEF), el cual cambia del estado ADP al ATP de la HSP70 para el siguiente ciclo durante el proceso de plegamiento.

HSP60: En plantas estas chaperonas han sido poco estudiadas. Estas proteínas juegan un rol esencial en todas las células, asistiendo a una gran variedad de proteínas *de novo* sintetizadas y transportadas, con la finalidad de facilitar el plegado de proteínas o bien asistiendo en replegamiento de proteínas desplegadas (Bukau y Horwich, 1998; Wang y col., 2004). En *A. thaliana* hay 7 miembros de esta familia, los cuales están localizados en citoplasma, mitocondria y cloroplasto (Wang y col., 2004).

sHSP: La función de estas chaperonas es prevenir la agregación de proteínas y/o estabilizar proteínas desplegadas (Scharf y col., 2012; Waters, 2013). Las sHSP están ampliamente distribuidas en toda la célula, en citoplasma, núcleo, cloroplasto, mitocondria, retículo endoplasmático y perisoxoma (Scharf y col., 2012; Waters, 2013).

2.3.2 La compleja red de las HSP bajo condiciones de estrés

Los procesos de plegamiento y ensamble de proteínas dentro de la célula son controlados por una red de control de calidad asistido por las HSP, las cuales operan bajo condiciones normales, pero su papel es especialmente importante durante condiciones de estrés (Bukau y col., 1999). De esta manera, las diferentes clases de HSP cooperan en la protección celular y juegan papeles complementarios o sobrelapados bajo condiciones de estrés (Fig. 4). Para

mantener la homeostasis celular, las sHSP actúan uniéndose a proteínas desplegadas, para estabilizar la conformación de estas proteínas, prevenir su agregación y mantenerlas en un estado competente para el replegamiento por el sistema de chaperonas HSP60, HSP70 y HSP90, dependiente de ATP (Narberhaus, 2002; Hahn y col., 2011). Por otro parte, altos niveles de proteínas desnaturalizadas o desplegadas forman agregados proteicos, debido a la interacción entre sus aminoácidos hidrofóbicos, pero pueden ser rescatados por la acción cooperativa de las HSP100 y HSP70 para su re-solubilización y replegamiento, respectivamente, o bien para su degradación por el proteosoma (Goloubinoff y col., 1999; Hahn y col., 2011). Las HSP90 y HSP70 participan en la transducción de señales y activación de factores de transcripción de choque térmico (HSF), los cuales son requeridos para la activación de una serie de genes de estrés que codifican para chaperonas moleculares, y otras proteínas de respuesta a estrés (Hahn y col., 2011; Fig. 4).

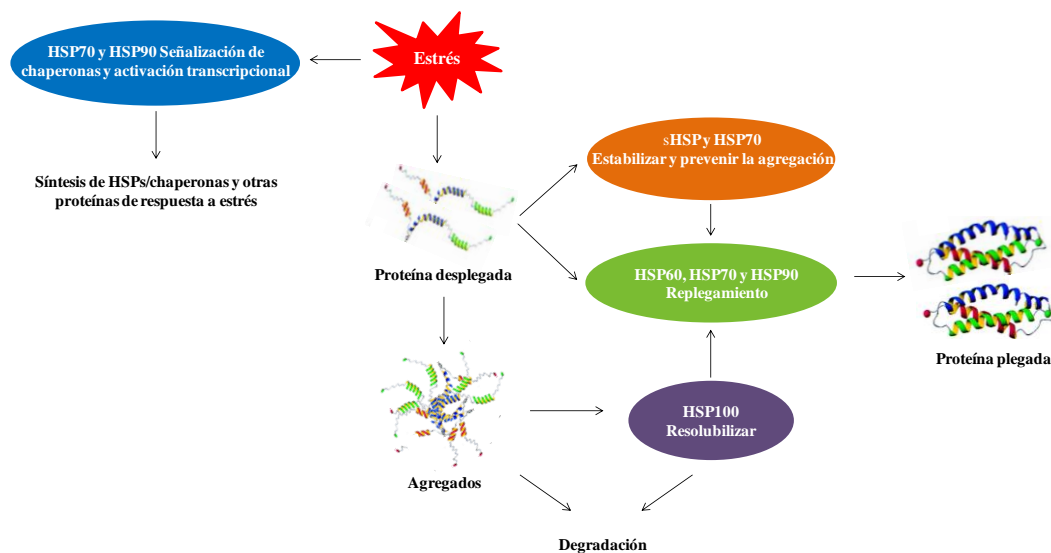


Figura 4. La red de proteínas de choque térmico (HSP) en la respuesta a estrés abiótico. Las proteínas que participan en la red de chaperonas para contrarrestar los efectos del estrés abiótico son las proteínas: HSP100, 90, 70, 60 y las sHSP, para proteger y mantener a las proteínas desplegadas en un estado competente para el replegamiento. Esta imagen se adaptó de Wang y col., 2004.

Se ha reportado que en diferentes especies de plantas bajo condiciones de estrés, las HSP90, HSP70 y sHSP aumentan sus niveles de expresión, por ejemplo el RNAm de las HSP70 y HSP90 pueden incrementar alrededor de 10 veces, mientras que las sHSP incrementan hasta 200 veces (Wahid y col., 2007).

2.4 Proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSP)

Las proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSP) pertenecen a una familia de proteínas conservadas, que se encuentran presentes en los reinos Archae, Bacteria y Eucarya (Caspers y col., 1995). Las sHSP constituyen una familia de las HSP estructuralmente diversas y abundantes, sintetizadas por las plantas, por lo general indetectables en condiciones normales pero pueden ser inducidas por condiciones de estrés y en etapas de desarrollo (Sun y col., 2002).

Las sHSP están definidas por un dominio α -cristalino de aproximadamente 100 aa, este dominio contiene una región consenso característica (AxxxnGvL), que se encuentra conservado en todas las sHSP de plantas (Fig. 5; Waters y col., 1996; Scharf y col., 2001). Además, este dominio contiene otras dos regiones consenso I y II, separadas por una región hidrofílica de longitud variable, las cuales presentan los motivos Pro-X₍₁₄₎-Gly-Val-Leu y Pro-X₍₁₄₎-X-Val/Leu/Ile-Val/Leu/Ile, respectivamente (Assab y col., 2011; Mahmood y col., 2010). Las funciones que se han sugerido para el dominio α -cristalino, son la interacción con las proteínas desplegadas y participar en la formación de dímeros. Este dominio, está flanqueado por una región N-terminal, altamente variable en tamaño y en secuencia. Por la variabilidad de su secuencia, se ha sugerido que está involucrado en la especificidad y unión al sustrato. Además, contiene péptidos que permiten dirigirlas a los organelos (Scharf y col., 2001; Waters, 2013). En la región C-terminal, presenta el motivo básico-X-Ile/Val-X-Ile/Val, se ha sugerido que está involucrado en la formación y estabilización de la estructura oligomérica (Scharf y col., 2001; Vierling, y col., 2009), y además puede contener motivos de retención a organelos (Fig. 5; Waters, 2013).



Figura 5. Dominios de las proteínas sHSP. Los dominios presentes en las proteínas sHSP son: el dominio α -cristalino, la región N-terminal y la región C-terminal.

La mayoría de las chaperonas moleculares son dependientes de ATP, mientras que las sHSP son independientes, como consecuencia, no presentan la capacidad de replegamiento (Narberhaus, 2002). Sin embargo, las sHSP han sido catalogadas como chaperonas moleculares, desde que se unen a proteínas desplegadas y de ese modo previenen interacciones inapropiadas y evitan su agregación (van Montfort y col., 2001a; Nakamoto y Vigh, 2007). La unión de proteínas desplegadas a las sHSP, pueden crear un reservorio de proteínas, que posteriormente pueden ser replegadas por otro sistema de chaperonas moleculares (Lee y Vierling 2000; Narberhaus, 2002; Haslbeck y col., 2005).

2.4.1 Estructura y oligomerización de las sHSP

La masa monomérica de las sHSP está entre el intervalo de 12 a 42 kDa, pero en su estado nativo forman oligómeros que varían de tamaño (200-800 kDa) y de estructura (Waters y col., 1996; Vierling y col., 2009). Actualmente, se ha determinado la estructura tridimensional de algunas sHSP, tales como la HSP16.5 de *Methanococcus jannaschii* de 24 monómeros (Kim y col., 1998), HSP16.9 de *Triticum aestivum* de 12 monómeros (Fig. 6; van Montfort y col., 2001b) y HSP21 de *A. thaliana* de 12 monómeros (Lambert y col., 2011). La estructura cristalina de las sHSP, muestra 9 cadenas β y 3 α -hélice, la distribución depende de cada proteína (Fig. 6; Kim y col., 1998; van Montfort y col., 2001b; Lambert y col., 2011). El dominio α -cristalino consiste de 8 cadenas β (β 2- β 9), organizadas en 2 hojas plegadas, flanqueadas por una región N-terminal y C-terminal, las cuales son variables en longitud y estructura (Mymrikov y col., 2011). La región C-terminal presenta una cadena corta β 10, mientras que la región N-terminal es flexible y

desordenada, y a menudo obstruye su cristalización (Bagneris y col., 2009). En la mayoría de los casos, la cadena $\beta 6$ de un monómero interactúa con la cadena $\beta 2$ del otro monómero, la cual estabiliza el dímero (Kim y col., 1998; van Montfort y col., 2001b; Mymrikov y col., 2011).

La oligomerización de las sHSP se considera importante para la unión al sustrato y para la función como chaperona, aunque los tamaños de los oligómeros pueden variar dependiendo de cada sHSP (Sun y MacRae, 2005). La disociación y re-asociación de los complejos oligoméricos de la sHSP es rápido (dímeros o trímeros; Friedrich y col., 2004). El modelo más caracterizado es la estructura de la sHSP de *Mycobacterium tuberculosis* de 150 kDa formados por trímeros de la HSP16.3 (Chang y col., 1996). En plantas el ensamble de los complejos de las sHSP es de 200 a 300 kDa (Waters y col., 1996) y en levaduras y mamíferos está entre 400 a 800 kDa (Carver y col., 1995).

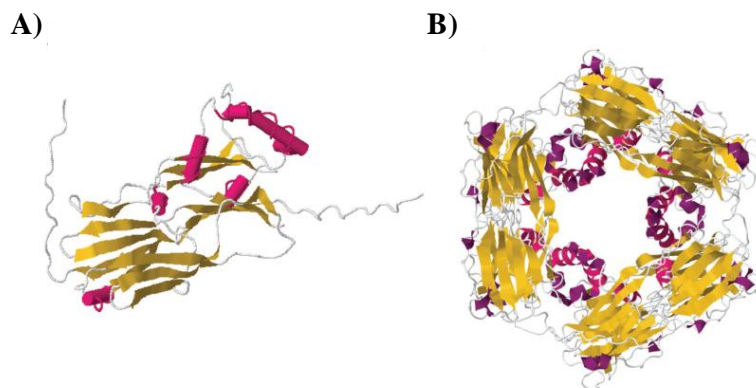


Figura 6. Estructura cristalizada de la proteína HSP16.9 de *Triticum aestivum*. A) La estructura de la proteína HSP16.9 del monómero de *T. aestivum*. B) La estructura oligomérica de la proteína HSP16.9, es un dodecámero. Las cadenas β en amarillo y las hélices α en rosa. Esta imagen se obtuvo de Waters, 2013.

2.4.2 Mecanismo de acción de las chaperonas sHSP

Las sHSP actúan como chaperonas moleculares ya que interactúan con proteínas desplegadas, y así previenen su agregación para mantenerlas en un estado competente de replegamiento (Ehrnsperger y col., 1999; Haslbeck y col., 1999). El reconocimiento y unión a las estructuras parcialmente desplegadas es mediante la exposición de regiones hidrofóbicas, las cuales son características de los intermediarios desplegados, por lo que la hidrofobicidad es un parámetro importante para la interacción chaperona-sustrato (Yeh y col., 1994).

El mecanismo de acción de las sHSP ocurre de la siguiente manera: (i) los oligómeros de la sHSP son estructuras dinámicas cuyas subunidades continuamente se disocian y re-asocian, ya sean en dímeros o monómeros, (ii) las proteínas desplegadas exponen sus regiones hidrofóbicas, las cuales son propensas a su agregación, (iii) el dímero de la sHSP se une a la proteína desplegada, y forman grandes complejos de sHSP-proteína, (iv) para el replegamiento de las proteínas, los complejos sHSP-proteína requieren de la acción de la maquinaria de las HSP70, co-chaperonas y ATP, (v) con la falta de suficiente sHSP para capturar a la proteína desplegada, se forman agregados de proteínas que son difíciles de eliminar, (vi) los complejos sHSP-proteína también pueden participar con las proteasas celulares, aunque esta ruta está menos estudiada que la ruta del replegamiento (Fig. 7; Basha y col., 2011).

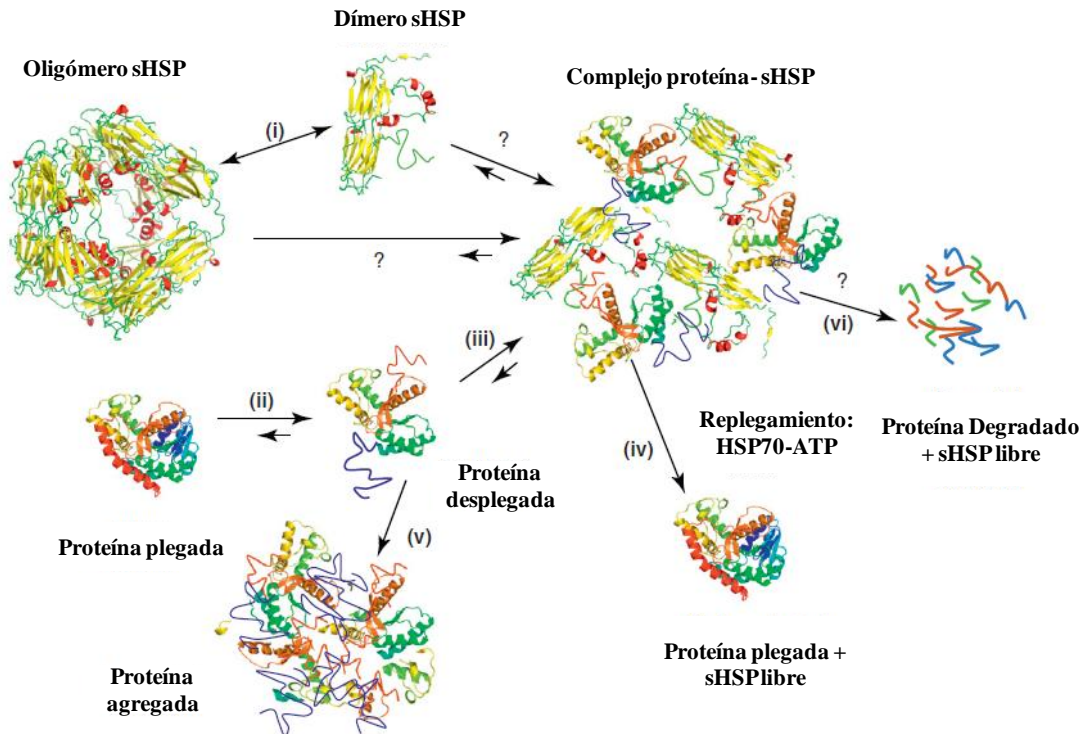


Figura 7. Mecanismo de acción de las proteínas sHSP. La función de las sHSP es proteger y mantener las proteínas desplegadas en un estado competente de replegamiento, y posteriormente ser replegadas por acción de otras chaperonas moleculares, tales como las HSP70 y sus co-chaperonas. Esta imagen se adaptó de Basha y col., 2011.

2.4.3 Las sHSP de plantas: una amplia familia de proteínas

Las sHSP comparten muchos aspectos como es la estructura y función, sin embargo el número de las sHSP varía entre especies de plantas: en *A. thaliana* tiene 19 (Scharf y col., 2001), *Oryza sativa* (arroz) tiene 23 y *Populus trichocarpa* tiene 36 (Waters y col., 2008). Las sHSP de planta son codificadas por genes nucleares y están agrupadas por subfamilias con base a su localización intracelular y sus homologías (Scharf y col., 2001; Sun y col., 2002). La familia sHSP de *A. thaliana*, incluye 7 subfamilias que están localizadas en citoplasma/núcleo (CI-CVII) y 5 subfamilias localizadas en organelos tales como en cloroplasto (CP), mitocondria (MTI y MTII), retículo endoplasmático (ER) y peroxisoma (Po; Fig. 8; Siddique y col., 2008; Waters y col., 2008; Bondino y col., 2011; Waters, 2013).

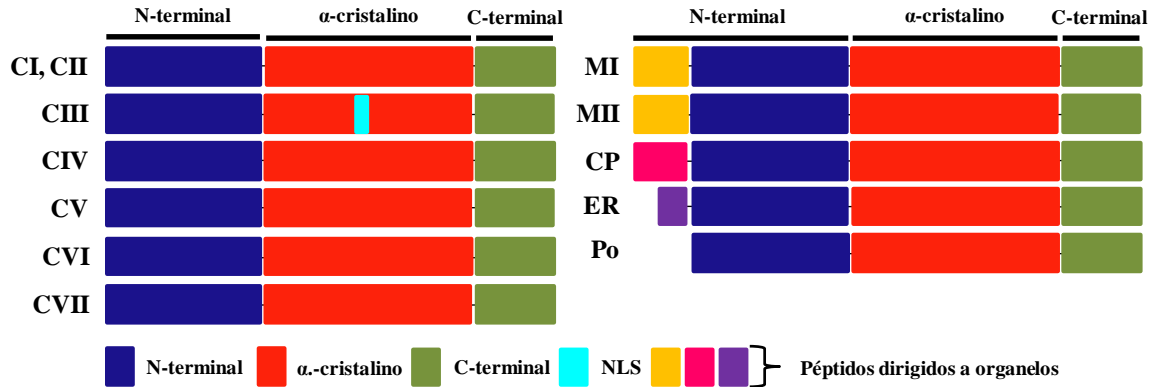


Figura 8. Clasificación y estructura de las sHSP de plantas. Las 12 subfamilias de sHSP en *Arabidopsis thaliana*, las cuales son de la clase citoplasmática (CI-CVII), mitocondria (MTI y MTII), cloroplasto (CP), retículo endoplasmático (ER) y peroxisoma (Po). El dominio α-cristalino está representado en rojo, región N-terminal en azul, región C-terminal en verde, secuencia de localización nuclear (NLS) en azul claro, y péptidos dirigidos a organelos de mitocondria (M) en amarillo, cloroplasto (CP) en rosa y retículo endoplasmático (ER) en morado.

Además de las 19 sHSP de *A. thaliana*, se han identificado 25 proteínas que presentan uno o más dominios α-cristalino (ACD; alpha-crystalline domain; Scharf y col., 2001), y en *O. sativa* se han identificado 17 genes que codifican para las proteínas ACD (Sarkar y col., 2009); sin embargo estas proteínas no están relacionadas con las subfamilias de las sHSP (Scharf y col., 2001). Actualmente, el conocimiento de esta nueva clase de proteínas es muy limitado.

El patrón de expresión de las sHSP, son inducidas principalmente en calor, sin embargo, algunas se expresan bajo estrés salino, oxidativo, osmótico, frío, sequía, exposición a UV-B y por heridas (Zimmerman y col., 2004; Waters y col., 2008, 2013). Además, algunas de las sHSP se expresan en etapas específicas de desarrollo (Waters, 2013). Para obtener una visión más amplia del comportamiento de la expresión de los genes de *A. thaliana*, el consorcio AtGenExpress proporciona datos del transcriptoma de la planta de *Arabidopsis*, bajo condiciones de estrés abióticos, en etapas de desarrollo, entre otros. De esta manera, Siddique y col. (2008) y Waters (2013), recopilaron los datos de los perfiles de expresión de las subfamilias de las sHSP de *A. thaliana* (los datos se

obtuvieron de los datos de microarreglo del sitio web AtGenExpress (www.arabidopsis.org/info/expression/ATGenExpress.jsp).

Tabla 1. Patrones de expresión en estrés abiótico y etapas de desarrollo de los miembros de las subfamilias de las sHSP de *A. thaliana*. La información que se presenta está basada en los datos publicados (Siddique y col., 2008; Waters y col., 2008).

Subfamilia	Gen ID	Estrés	Desarrollo
Citosólica I			
1 AtHSP17.4	At3g46230	C, Os, S, D, Ox, UV-B, He	Polen, Semilla
2 AtHSP17.6A	At1g59860	C, Os, S, D, Ox, UV-B, He	Polen, Semilla
3 AtHSP17.6B	At2g29500	C, Os, S, D, Ox, UV-B, He	Polen, Semilla
4 AtHSP17.6C	At1g53540	C, Os, S, D, Ox, UV-B, He	Polen, Semilla
5 AtHSP17.8	At1g07400	C	Flores
6 AtHSP18.1	At5g59720	C, Os, S, D, Ox, UV-B, He	
Citosólica II			
7 AtHSP17.6	At5g12020	C, Os, S, Ox, UV-B, He	Polen
8 AtHSP17.7	At5g12030	C, Ox, S, D, Ox, UV-B	Polen, Semilla
Citosólica III			
9 AtHSP17.4	At1g54050	Constitutiva, C	Hojas de roseta, Flores, Polen, Semilla
Citosólica IV			
10 AtHSP15.4	At4g21870	Constitutiva, C, He	Plántulas, Hojas de roseta, Flores, Semilla
Citosólica V			
11 AtHSP21.7	At5g54660	Constitutiva	Plántulas, Hojas de roseta, Flores
Citosólica VI			
12 AtHSP18.5	At2g19310	Constitutiva, C	Plántulas
Citosólica VII			
13 AtHSP14.2	At5g47600	No	Flores
Mitocondria I			
14 AtHSP23.5	At5g51440	C, Ox, UV-B	No
15 AtHSP23.6	At4g25200	C, Ox, UV-B	No
Mitocondria II			
16 AtHSP26.5	St1g52560	C, Os, S	Semilla
Cloroplasto			
17 AtHSP21	At4g27670	C, Os, S	No
Retículo endoplasmático			
18 AtHSP22	At4g10250	C, Os	No
Perioxosoma			
19 AtHSP15.7	At5g37670	C, Os, S, Ox, UV-B	Semilla

No: ninguna expresión, C: calor, Os: osmótico, S: salino, D: sequía, Ox: oxidativo, He: heridas.

Dos características funcionales que se destacan de las sHSP de las otras HSP son: 1) la actividad de las sHSP para unirse a la proteína desplegadas son independientes de ATP y 2) tienen una alta capacidad de unión a proteínas

desplegadas (Haslbeck y col., 2005; Waters, 2013). Por lo tanto, las sHSP participan con otras chaperonas moleculares (HSP), para proteger y mantener al sustrato desplegado en un estado competente para el replegamiento por la maquinaria de la HSP70 y sus co-chaperonas DnaJ y NEF (Narbehaus, 2002).

2.5 Proteínas co-chaperonas HSP40 ó DnaJ ó proteínas J

Las HSP son fundamentales para la supervivencia de la célula en condiciones de estrés para asegurar el plegamiento correcto de las proteínas desplegadas, estas incluyen una de las familias más conservadas que son las HSP70 junto con sus co-chaperonas HSP40 y NEF. Estas proteínas son las más abundantes y mejor caracterizadas de las HSP tanto en sistemas procariontes como en eucariontes (Rajan y D´Silva, 2009). En conjunto, estas proteínas constituyen una maquinaria de chaperonas que participan en el plegamiento de proteínas desplegadas, en la prevención de la agregación de proteínas, la translocación de proteínas a través de membranas y proteínas dirigidas a degradación (Craig y col., 2006; Qiu y col., 2006). Los organismos contienen varias proteínas HSP70, usualmente uno a dos por compartimento celular, y cada una participa en una amplia variedad de procesos celulares. Sin embargo, la especificidad de las funciones de estas proteínas en distintos procesos celulares, es determinado por sus co-chaperonas (HSP40; Craig y col., 2006). Los miembros de la familia HSP40 son más numerosos que los de la familia HSP70, por ejemplo: en levadura están presentes 14 HSP70 y 22 HSP40, en humano son 21 HSP70 y 41 HSP40 y en *Arabidopsis* son 18 HSP70 y 120 HSP40 (Qiu y col., 2006; Walsh y col., 2004; Rajan y D´Silva, 2009). De esta manera, una HSP70 interactúa con múltiples HSP40 para llevar a cabo una variedad de procesos celulares, formando una compleja red de chaperonas (Rajan y D´Silva, 2009).

La familia HSP40, también se conocen como DnaJ o proteínas J en plantas, las cuales regulan la actividad ATPasa de las HSP70, y además estabilizan su interacción con las proteínas blanco (Bukau y Horwich, 1998; Walsh y col., 2004).

2.5.1 Estructura de las proteínas J

Todos los miembros de la familia de las proteínas J, presentan en la región N-terminal, el “dominio J” característico conformado de aproximadamente de 75 aa conservados, los cuales forman una estructura secundaria de 4 α -hélices y una región de loop entre las hélices II y III. La región entre las hélices contiene un tri péptido histidina – prolina - ácido aspártico (HPD) altamente conservado, el cual es esencial para la interacción con las proteínas HSP70 (DnaK; Fig. 9; Tsai y Douglas 1996). La función del dominio J consiste en el acoplamiento con las proteínas DnaK y la subsiguiente estimulación de la actividad ATPasa de la DnaK (Li y col., 2007). Además del dominio J, las proteínas J contienen otras regiones conservadas, las cuales son críticas para sus funciones. Este dominio está separado por una región flexible que consta de 50 – 100 aa ricos en glicina y fenilalanina, denominado como “región G/F”. Esta región se ha sugerido que sirve como una región flexible y que controla la especificidad de las funciones de las proteínas J (Fig. 9; Craig y col., 2006). Después de la región G/F, está la región rica en cisteína la cual forma un “dominio dedo de zinc”, que contiene cuatro motivos repetidos (CXXCXGXG), este dominio es esencial para mediar las interacciones proteína – proteína entre DnaK, proteínas J y la proteína blanco (Fig. 9; Szabo y col., 1996; Bukau y Horwich, 1998; Lu y Cyr, 1998). Por último, una “región C-terminal” pobremente conservada y de tamaño variable, es importante para proporcionar la especificidad de la maquinaria HSP70 – proteínas J, y además juega un papel importante en la unión al sustrato y su secuestro dentro de la HSP70 (Fig. 9; Yan y Craig, 1999; Li y col., 2003; Shi y col., 2005). El dominio J y la región rica en G/F, son importantes para la interacción con la proteína DnaK, mientras que el dominio dedo de zinc y la región C-terminal, están involucrados en la interacción y en la unión al sustrato (Fig. 8; Bukau y Horwich, 1998; Shi y col., 2005).

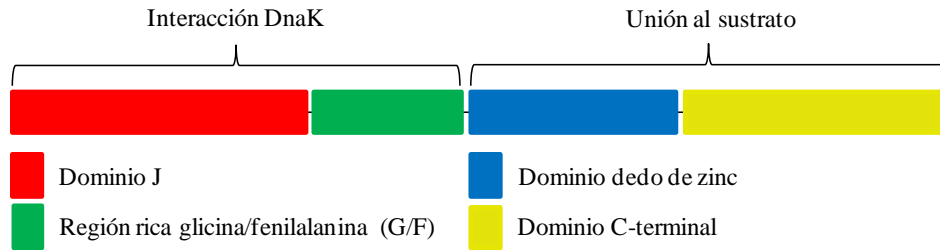


Figura 9. Estructura de las proteínas J. Los dominios están representados por cajas de colores: dominio J y la región rica en glicinas y fenilalanina (G/F) interactúan con las proteínas DnaK (caja rojo y verde, respectivamente), el dominio dedo de zinc y la región C-terminal intervienen en la unión al sustrato (caja azul y amarillo, respectivamente).

2.5.2 Clasificación de las proteínas J

En el genoma de *A. thaliana*, se han identificado 116 proteínas J y 4 proteínas tipo J (Rajan y D´Silva, 2009). La clasificación de las proteínas J se basa en la presencia de las regiones ó dominios conservados (Fig. 10; Cheetham y Caplan 1998; Rajan y D´Silva, 2009). El primer grupo denominado Tipo I ó A, presenta todos los dominios, el dominio J, región G/F, dominio dedo de zinc y la región C-terminal (Fig. 10). En lo que respecta al grupo Tipo II ó B, este carece del dominio dedo de zinc, y el grupo Tipo III ó C, carece tanto de la región rica en glicinas y fenilalanina (G/F), como la del dominio dedo de zinc (Fig. 10). El grupo Tipo IV ó D se ha identificado recientemente como proteínas tipo J (JLP), el cual la secuencia del dominio J es similar, excepto que carece del motivo HPD (Walsh y col., 2004). De las 120 proteínas J, 8 pertenecen al Tipo I ó A, 16 al Tipo II ó B, 92 al Tipo III ó C y 4 proteínas JLP (Rajan y D´Silva, 2009).

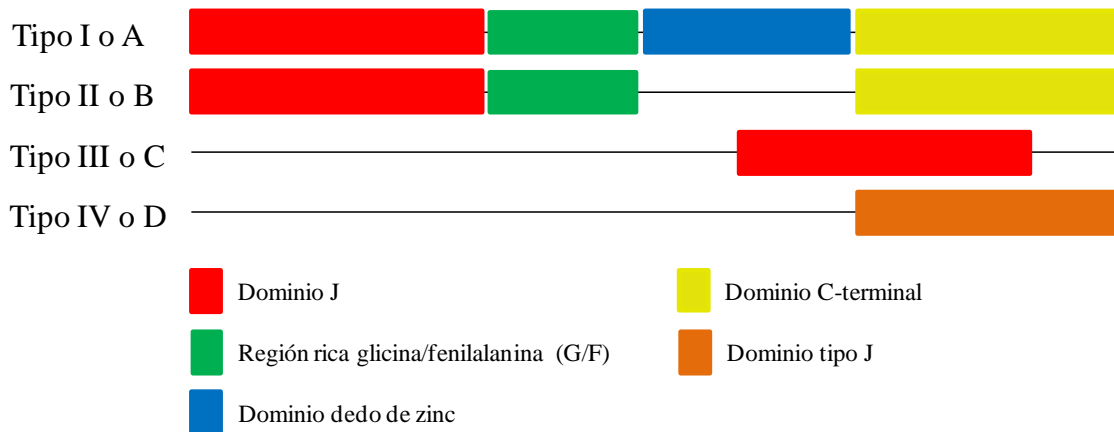


Figura 10. Clasificación de las proteínas J. Las proteínas J se clasifican en Tipo I ó A presentan el dominio J, región rica en glicinas y fenilalanina (G/F), el dominio dedo de zinc y la región C-terminal. El Tipo II ó B incluyen los dominios mencionados anteriormente excepto el dominio dedo de zinc y por último el Tipo III ó C solamente presentan el dominio J. El Tipo IV ó D, presenta el dominio J, excepto de que varía en el tri-péptido HPD. Esta imagen se adaptó de Rajan y D´Silva, 2009.

Todas las proteínas J de *A. thaliana* que pertenecen a las tres primeras clases (I, II y III) poseen un dominio J funcional que puede interactuar con las proteínas HSP70 y estimular su actividad de ATPasa (Cheetham y Caplan 1998; Miernyk, 2001). Las proteínas pertenecientes a las del Tipo I y II, consisten de una región G/F después del dominio J. En general, las proteínas del Tipo I se componen de una región corta de G/F compuesta de 40 – 50 aa, mientras que las proteínas del Tipo II, la región G/F tiende a ser más larga, entre 70 – 120 aa con un alto grado de variabilidad en la secuencia de glicina y fenilalanina, además es requerida para la estabilidad y el posicionamiento preciso del dominio J para interactuar con la HSP70 (Cheetham y Caplan 1998; Craig y col., 2006). El dominio dedo de zinc de las proteínas Tipo I, es considerado como una “dominio firma”, el cual consiste de CXXCXGXG (C: cisteína, X: otro aminoácido y G: glicina; Rajan y D´Silva, 2009). De las 8 proteínas que conforman al grupo Tipo I, una de ellas presenta una región transmembranal. Sin embargo, las proteínas Tipo III presentan diferentes tipos de dominios dedo de zinc, los cuales proporcionan otras funciones, tales como unión a DNA; unión a zinc, involucrado en la biosíntesis de diftamida, regulación de la cromatina y unión a RNA (Rajan y D´Silva, 2009). Las proteínas

del Tipo I y II de *A. thaliana* tienen una región C-terminal similar (Rajan y D´Silva, 2009). La sustitución de aa en el motivo conservado HPD del dominio J, da un pseudo-dominio (Tipo J), como se observa en las proteínas Tipo IV, las sustituciones pueden ser histidina, valina y aspartato (HVD), ó asparagina, asparagina y valina (NNA), ó arginina, asparagina y alanina (RNA; Peng y col., 2005). Además, las proteínas Tipo II y III, presentan otros dominios ó regiones adicionales, tales como la región transmembranal, coiled coil y tetratricopeptido (Rajan y D´Silva, 2009).

2.5.3 Mecanismos de acción de las proteínas J

Las proteínas HSP70 son altamente versátiles ya que pueden asistir a una gran variedad de procesos, uno de ellos es el plegamiento de proteínas para prevenir su agregación. El plegamiento de proteínas mediada por las HSP70 es dependiente de co-chaperonas como las proteínas J estimulando la hidrólisis de ATP; proceso en el cual también participa el factor de cambio de nucleótido (NEF; Nollen y Morimoto, 2002).

Las proteínas HSP70 existen en dos estados de unión a nucleótido (ATP y ADP), y presenta dos dominios importantes, los cuales son el dominio de unión a nucleótido (NBD) y dominio de unión al sustrato (SBD). En el estado HSP70-ATP, la proteína se une directamente a las proteínas desplegadas a través del SBD (1). Sin embargo, las proteínas J se pueden unir directamente al sustrato desplegado a través de sus dominios dedo de zinc y C-terminal (2). La proteína J se une directamente al complejo HSP70-ATP/sustrato, ya sea sola o a veces con el sustrato desplegado a la proteína HSP70-ATP (3). El dominio J, de la proteína J, interactúa con el dominio ATPasa de la HSP70 estimulando la hidrólisis del ATP, de esta manera estabilizando el complejo HSP70-ADP/sustrato (4). El factor de cambio de nucleótido (NEF), intercambia el ADP por ATP para el siguiente ciclo del proceso de plegamiento (5; Fig. 11; Bukau y Horwich 1998; Rajan y D´Silva, 2009).

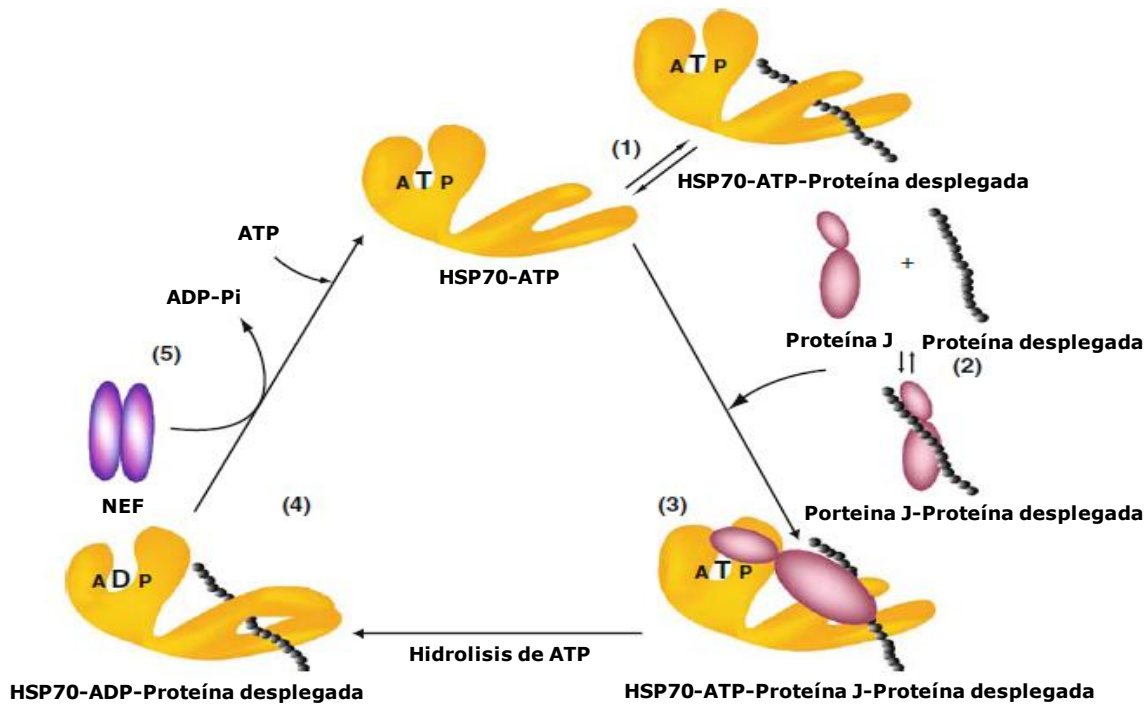


Figura 11. Mecanismos de acción de las proteínas J. El mecanismo de regulación de las HSP70 es dependiente de sus co-chaperonas, las proteínas J y el factor de cambio de nucleótido (NEF), para el proceso de replegamiento de las proteínas desplegadas. Esta imagen se adaptó de Rajan y D´Silva, 2009.

2.5.4 Localización y funcionalidad de las proteínas J

Las proteínas J de *A. thaliana* están codificadas en el núcleo, se sintetizan en el citoplasma y posteriormente se dirigen a los diferentes compartimentos subcelulares. De las 120 proteínas J, 50 proteínas han sido localizadas en el citosol, 24 en el núcleo, 19 en mitocondria, 12 en cloroplasto, nueve en retículo endoplasmático, tres en el citoesqueleto, dos en vacuolas y una en la membrana plasmática (Rajan y D´Silva, 2009). El sitio de la función biológica de cada una de las proteínas J se le atribuye a su destino celular y a su interacción con las proteínas HSP70.

Las proteínas J citosólicas son las más abundantes y altamente expresadas durante diferentes condiciones de estrés para prevenir la agregación de las

proteínas en el citosol (Rajan y D´Silva, 2009). La proteína Ydj1 de *S. cerevisiae*, forma parte de la maquinaria HSP70 requerida para la estructura correcta de la mayoría de las proteínas sintetizadas en el citosol, y juega un papel crítico en la homeostasis de las proteínas celulares (Zhou y col., 1999). Las proteínas J localizadas en el retículo endoplasmático (ER), desempeñan un papel a nivel postraduccional, promoviendo la translocación de la proteína a través de la membrana del ER en asociación con la proteína HSP70 (Brodsky y Schekman, 1993). Las proteínas J At3g62600 y At3g08970 de *Arabidopsis* del grupo Tipo I y II, respectivamente, se requieren para el plegamiento de las proteínas y el control de calidad en el ER (Yamamoto y col., 2008). Las proteínas J de la mitocondria se localizan en la membrana interna o en la matriz, y el transporte de las pre-proteínas a la matriz mitocondrial está mediado por las proteínas J de la membrana interna mitocondrial en asociación con la HSP70 mitocondrial (Frazier y col., 2004). En el cloroplasto las proteínas J At1g80920, At4g36040 y At2g17880 funcionan como co-chaperona de la HSP70 del estroma (Zybailov y col., 2008). La proteína J At1g68370 de *Arabidopsis* localizada en el citoesqueleto, está involucrada en la transducción de señales en el gravitropismo, y están influidas por los cambios de pH y las auxinas (Boonsirichai y col., 2003).

2.6 Genes de repuesta a estrés

En plantas, los mecanismos de respuesta a estrés para conferir tolerancia, son mediados por programas de expresión génica diferencial. Para comprender los mecanismos moleculares de respuesta, es importante identificar, clonar y estudiar los genes que se expresan diferencialmente en una condición específica. Las bibliotecas de cDNA y sustractivas (SSH), han sido herramientas poderosas para identificar y aislar genes expresados diferencialmente.

Actualmente, se han reportado diversas bibliotecas de cDNA y sustractivas (SSH) en plantas con un alto nivel de importancia agronómica bajo condiciones de estrés abiótico, en donde se han identificado un conjunto de genes de respuesta a estrés

y que son interesantes para su caracterización funcional (Hernández-Lucero y col., 2008; 2013; Ochoa-Alfaro y col., 2012). Por consiguiente se ha utilizado a *Arabidopsis thaliana* como un modelo de estudio, ya que es el modelo más avanzado para el estudio de la biología molecular vegetal, debido a que cuenta con una amplia variedad de herramientas para la caracterización de genes de interés como: líneas mutantes insercionales de T-DNA (pérdida de función), construcción de líneas transgénicas sobreexpresantes, bases de datos de microarreglos bajo diversas condiciones de estrés y de desarrollo, sistema de transformación genética eficiente, entre otros.

2.7 Nopal (*Opuntia* spp.)

El nopal (*Opuntia* spp.), es un cactus arborescente perenne ampliamente distribuido 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 E.U.A., Nuevo México y Texas; Flores y col., 1995), donde juega un papel estratégico en la subsistencia de la agricultura en las regiones semiáridas y áridas (Pimienta-Barrios, 1994).

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 (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, 2003); tallos modificados que presentan estructuras en forma de raquetas llamados cladodios ó pencas, que llevan a cabo la fotosíntesis y son suculentos porque tiene 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 poros pequeños hundidos (baja densidad de estomas). 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. Además, presentan 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-Durán y col., 2001). Otras de las adaptaciones que exhiben las plantas de *Opuntia* es la fotosíntesis del Metabolismo de las Crasuláceas (CAM), en el que se produce el intercambio de CO₂ en la noche, donde la diferencia de presión de vapor de agua entre el aire y las superficies de transpiración es más baja, lo que resulta en una alta eficiencia en el uso del agua (Winter y col., 2005)

El nopal pertenece al género *Opuntia* y a la familia Cactaceae, se conocen cerca de 300 especies del género *Opuntia*, pero solo 10 ó 12 especies se aprovechan para la producción de fruta y nopalitas tales como: *Opuntia ficus-indica*, *O. amyclaea*, *O. xocconostle*, *O. megacantha*, *O. streptacantha*, *O. hyptiacantha*, *O. leucotricha* y *O. robusta* (Sáenz y col., 2006).

En la actualidad los principales usos del nopal son como alimento y forraje (Pimienta, 1990; Barbera, 1995). El nopalito se usa en la producción de escabeche y en salmuera 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, entre otros. Además, se utilizan para la producción de forraje 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.) del cual se obtiene el colorante grana cochinilla (Barbera, 1995; Reyes-Agüero y col., 2006). El colorante es usado en la

industria farmacéutica, alimenticia, cosmetológica y textilera (Flores y col., 1995). El nopal es usado en otras aplicaciones alternativas como en la formación de cercos para limitar huertos familiares ó 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.

Además de que las Cactáceas muestran características fisiológicas y morfológicas que les han permitido adaptarse a diferentes condiciones ambientales adversas, podrían involucrar mecanismos moleculares para la percepción y la señalización que tendrán como resultado la expresión diferencial de genes que permitirán realizar ajustes metabólicos necesarios para tolerar al estrés y sobrevivir a dichas condiciones, por lo tanto es una planta modelo para estudiar los mecanismos moleculares para la de tolerancia al estrés abiótico.

2.8 Frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

El frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) es la leguminosa más cultivada en el mundo y es uno de los principales elementos nutricionales en México. Su producción alcanza el 8.3% de las cosechas mundiales; sin embargo se ha visto disminuido como resultado de problemas ambientales en los últimos años (SAGAR, 2000). *P. vulgaris* es un género Americano de aproximadamente 40 especies, encontrados principalmente en las zonas tropicales y subtropicales (Debouck, 1999). En México, la mayoría de las especies de *P. vulgaris* están distribuidas en un amplio rango de condiciones climáticas, variando desde caluroso, semicaluroso ó temperatura subhúmeda a caluroso semiseco moderadamente perturbada por la vegetación natural. La amplia distribución de poblaciones silvestres y su adaptación a diversos ambientes contribuye a su variabilidad fenotípica y genotípica (Delgado-Salinas, 1985). El frijol se cultiva en prácticamente todas las regiones del país, bajo todas las condiciones de suelo y clima. A nivel nacional

existen alrededor de 500 mil agricultores dedicados a la producción del cultivo de estudio.

La salinidad del suelo es una limitación importante para la producción de cultivos en todo el mundo, aunque algunos de ellos son moderadamente tolerantes a condiciones salinas, la mayoría se ven afectados de manera adversa aún por bajos niveles de sal (Greenway y Munns, 1980). Entre las consecuencias fisiológicas de la salinidad en las leguminosas está la dificultad de germinación de la semilla, la reducción en la formación de nódulos fijadores de nitrógeno, el retraso en su desarrollo y la reducción en el rendimiento de los cultivos. Una manera de reducir los efectos adversos de la salinidad del suelo en la producción, es el desarrollo de cultivares tolerantes a estrés salino.

2.9 *Arabidopsis thaliana*

En la actualidad, es de suma importancia entender los mecanismos moleculares de las plantas para adaptarse a condiciones desfavorables. De esta manera, el organismo modelo de planta es *Arabidopsis thaliana*, que es el más utilizado universalmente en la biología molecular, debido a la disponibilidad de técnicas y herramientas moleculares.

A. thaliana es una planta dicotiledónea pequeña que pertenece a la familia de *Brassicaceae* (mostazas), hoy en día, es el modelo de estudio más importante de la biología molecular de plantas, y también es un recurso para el estudio de otros organismos multicelulares. *A. thaliana* fue la primera planta cuyo genoma fue secuenciado completamente (The *Arabidopsis* genome Initiative 2000), y el tercer organismo multicelular después de *Caenorhabditis elegans* (The *C. elegans* secuenciado por el Consorcio en 1998) y de *Drosophila melanogaster* (Adams y col., 2000).

Arabidopsis, se considera como un organismo modelo de estudio debido a sus características, tales como un ciclo de vida corto (5 a 6 semanas), un tamaño pequeño (15-20 cm), produce un gran número de semillas (aproximadamente 5000 semillas por planta) que permanecen viables durante varios años, crece en espacios limitados y es fácilmente manipulable para la polinización dirigida. Aunque *Arabidopsis* no posee un valor agronómico, presenta varias ventajas muy importantes para la investigación básica en plantas.

Otra de las ventajas, es que cuenta con uno de los genomas más pequeños del reino vegetal con 125 Mb, codificando alrededor de 29,954 genes distribuidos en 5 cromosomas, y es un organismo diploide (2n). Para el estudio de la biología molecular, *A. thaliana* es genéticamente manipulada a través de la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Los protocolos de transformación son sencillos y permiten generar plantas transgénicas al introducir genes exógenos provenientes de otras especies de plantas ó bien genes endógenos de la misma planta. El protocolo para ello, llamado “el método de inmersión floral”, consiste simplemente en la inmersión de la flor en una solución conteniendo *Agrobacterium*, el DNA de interés y un detergente (Zhang y col., 2006), éste método evita la necesidad del cultivo de tejidos ó la regeneración de la planta.

Actualmente, se cuenta con base de datos de DNA, RNA y proteína de *A. thaliana* (TAIR: www.arabidopsis.org/), además de una base de datos generados por análisis de microarreglos empleando The Bio-Array Resource for Plant Functional Genomics (BAR) de la Universidad de Toronto (<http://bar.utoronto.ca/>), que indican el patrón de expresión de estos genes bajo condiciones de estrés abiótico, biótico, de desarrollo, entre otros. Finalmente, se cuenta con una gran variedad de líneas insercionales de T-DNA con pérdida de función lo cual permite estudiar funcionalmente genes de interés (Meinke, 1998; Koornneef y Meinke, 2010; Alonso, 2003). De esta manera, *Arabidopsis* aporta una herramienta esencial para el análisis funcional de un gran número de genes en una multitud de organismos, para los cuales su función aún es desconocida.

III. OBJETIVO

3.1 CAPÍTULO 1. OpsHSP18 de *Opuntia streptacantha*

Con base a lo expuesto anteriormente, el **objetivo general** del presente capítulo fue el siguiente:

“Caracterizar funcionalmente el gen *OpsHSP18* de *Opuntia streptacantha* que codifica una proteína de choque térmico de bajo peso molecular (sHSP) bajo condiciones de estrés abiótico”

Para lograr lo anterior, los **objetivos específicos** planteados fueron los siguientes:

1. Generar líneas sobreexpresantes del gen *OpsHSP18* (*35S::OpsHSP18*) de *O. streptacantha* en plantas de *A. thaliana*.
2. Realizar un árbol filogenético de la proteína OpsHSP18 de *O. streptacantha* y las proteínas sHSP de *A. thaliana*.
3. Determinar el fenotipo de las líneas sobreexpresantes *35S::OpsHSP18* de *A. thaliana*, en experimentos de germinación y ensayos de supervivencia bajo condiciones de estrés abiótico.
4. Construir un vector anzuelo (bait) que contenga el ORF del gen *OpsHSP18* del sistema de dos híbridos “Split ubiquitin” para la identificación de posibles interactores de la proteína OpsHSP18

3.2 CAPÍTULO 2. AtDjA2 y AtDjA3 de *Arabidopsis thaliana*

Con base a lo expuesto anteriormente, el **objetivo general** del presente capítulo fue el siguiente:

“Caracterizar funcionalmente los genes *AtDjA2* y *AtDjA3* de *Arabidopsis thaliana*, los cuales codifican proteínas de choque térmico de 40 kDa (HSP40) bajo condiciones de estrés abiótico”

Para lograr lo anterior, los **objetivos específicos** planteados fueron los siguientes:

1. Genotipificar líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3* de *A. thaliana*.
2. Generar líneas sobreexpresantes del gen *AtDJ2* (*35S::AtDJ2*) y de las dos versiones del gen *AtDJ3* (*35S::AtDJ3.1* y *35S::AtDJ3.2*) en plantas de *A. thaliana*.
3. Determinar el fenotipo de las líneas mutantes sencillas y sobreexpresantes de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*, en experimentos de germinación bajo condiciones de estrés abiótico.
4. Construir el vector anzuelo “bait” que contenga el ORF del gen *AtDJ2* para el sistema de dos híbridos “Split ubiquitin” para la identificación de posibles interactores de la proteína AtDjA2.

IV. CAPITULO 1. OpsHSP18 de *Opuntia streptacantha*

Ochoa-Alfaro y col. (2012), reportaron la construcción de una biblioteca de cDNA de cladodios de *Opuntia streptacantha* bajo diversas condiciones de estrés abiótico, con la finalidad de identificar y aislar genes inducidos en respuesta al estrés. Para construir la biblioteca de cDNA se aisló RNA a partir de una mezcla de cladodios de plantas de un año de edad tratadas con diversas condiciones de estrés abiótico: salinidad (250 mM), calor (40 °C), frío (4 °C) y sequía. De la biblioteca de cDNA se obtuvieron 329 unigenes, los cuales se clasificaron en 11 categorías funcionales, el 9% de respuesta a estrés, el 6% a metabolismo, el 7% de transporte celular y homeostasis de iones, el 6% de fotosíntesis, el 5% de síntesis de proteínas, el 4% de señalización, el 3% de plegamiento, degradación y modificaciones de proteínas, el 3% desarrollo, división y organización celular, el 2% de transcripción, el 13% de función desconocida, y el 42% no dieron hit con ninguna secuencia.

De los unigenes clasificados de respuesta a estrés, se seleccionó el unigen (102) que codifica para una proteína de choque térmico de bajo peso molecular (OpsHSP18), del cual obtuvimos el cDNA completo para su caracterización molecular y funcional. La secuencia del cDNA del gen *OpsHSP18* comprende una región 5'-UTR de 95 pares de bases (pb), una región 3'-UTR de 221 pb y un marco de lectura abierto (ORF) de 486 pb, codificando una proteína de 161 aa con un masa molecular predicha de 18.34 kDa y un punto isoeléctrico (pI) de 5.85. La proteína OpsHSP18, se agrupa con las proteínas citoplasmáticas de *Arabidopsis thaliana*. De esta manera, para caracterizar el gen *OpsHSP18* de nopal se generaron líneas transgénicas en *A. thaliana*, mediante la transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, con la finalidad de estudiar la tolerancia de estas líneas sobreexpresantes bajo condiciones de estrés abiótico.

Para analizar el fenotipo de las plantas transgénicas, éstas se sometieron a diversos agobios, como estrés salino (NaCl), osmótico (glucosa y manitol) y la

aplicación de la hormona ácido abscísico (ABA), en experimentos de germinación y ensayos de supervivencia. El resultado que se obtuvo en los experimentos de germinación fue que las líneas transgénicas (*35S::OpsHSP18*) presentaron un mayor porcentaje de germinación en comparación con la línea parental (Col-0), en todas las concentraciones probadas de NaCl (100, 125, 150, and 175 mM), glucosa, manitol (5, 6 y 7%) y ABA (3, 5, 7 y 9 μ M). Además, las líneas sobreexpresantes presentaron desarrollo de cotiledones verdes bajo la aplicación de NaCl y glucosa. En lo que respecta a los ensayos de supervivencia, la sobreexpresión del gen *OpsHSP18*, confirió tolerancia a estrés salino y osmótico.

Nuestros resultados sugieren que la proteína OpsHSP18 podría tener un papel importante en la tolerancia a estrés salino y osmótico, y además el fenotipo de insensibilidad a ABA de las líneas transgénicas en germinación podría sugerir alguna relación con la señalización del ABA.

Article

The *Opuntia streptacantha* OpsHSP18 Gene Confers Salt and Osmotic Stress Tolerance in *Arabidopsis thaliana*

Silvia Salas-Muñoz¹, Gracia Gómez-Anduro², Pablo Delgado-Sánchez³,
Margarita Rodríguez-Kessler⁴ and Juan Francisco Jiménez-Bremont^{1,*}

¹ Division of Molecular Biology, Institute Potosino of Scientific and Technological Research, Camino a la Presa de San José 2055, P.O.B. 3-74, C.P. 78216, Tangamanga, San Luis Potosí, SLP, Mexico; E-Mail: silvia.salas@ipicyt.edu.mx

² Agriculture in Dry Land Areas, The Northwest Centre of Biological Research, Mar Bermejo No. 195, Col. Playa Palo de Santa Rita, P.O.B. 128, C.P. 23090, La Paz, BCS, Mexico; E-Mail: gatito_comiendo@hotmail.com

³ Faculty of Agronomy, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Km. 14.5, Carretera San Luis Potosí-Matehuala, Soledad de Graciano Sánchez, P.O.B. 32, C.P. 78321, San Luis Potosí, SLP, Mexico; E-Mail: pablo.delgado@uaslp.mx

⁴ Faculty of Sciences, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Salvador Nava s/n, C.P. 78290, Col Lomas, San Luis Potosí, SLP, Mexico; E-Mail: mrodriguez@fc.uaslp.mx

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: jbremont@ipicyt.edu.mx; Tel.: +52-444-834-2000; Fax: +52-444-834-2010.

Received: 27 May 2012; in revised form: 1 August 2012 / Accepted: 7 August 2012 /

Published: 15 August 2012

Abstract: Abiotic stress limits seed germination, plant growth, flowering and fruit quality, causing economic decrease. Small Heat Shock Proteins (sHSPs) are chaperons with roles in stress tolerance. Herein, we report the functional characterization of a cytosolic class CI sHSP (OpsHSP18) from *Opuntia streptacantha* during seed germination in *Arabidopsis thaliana* transgenic lines subjected to different stress and hormone treatments. The over-expression of the *OpsHSP18* gene in *A. thaliana* increased the seed germination rate under salt (NaCl) and osmotic (glucose and mannitol) stress, and in ABA treatments, compared with WT. On the other hand, the over-expression of the *OpsHSP18* gene enhanced tolerance to salt (150 mM NaCl) and osmotic (274 mM mannitol) stress in *Arabidopsis* seedlings treated during 14 and 21 days, respectively. These plants showed increased survival rates (52.00 and 73.33%, respectively) with respect to the WT (18.75 and 53.75%, respectively). Thus, our results show that *OpsHSP18* gene might have

an important role in abiotic stress tolerance, in particular in seed germination and survival rate of *Arabidopsis* plants under unfavorable conditions.

Keywords: abiotic stress; abscisic acid; *Arabidopsis thaliana*; germination; *Opuntia streptacantha*; small heat shock protein

1. Introduction

Abiotic stress such as drought and salinity impose serious limitations to plant growth, development and crop productivity [1]. In order to survive adverse conditions, plants have developed multiple strategies, including physiological, biochemical and molecular mechanisms to counteract damages caused by environmental conditions. At the molecular level, the expression of stress responsive genes has been classified into: the early- and the delayed-response genes. The first group of genes is induced very quickly and often transiently after stress perception, such as kinases and transcription factors. The delayed-response genes are activated more slowly and their expression is often sustained during the stress conditions, encoding stress proteins such as heat shock proteins (HSPs), late embryogenesis abundant (LEAs), aquaporins, enzymes for osmolyte metabolism, antioxidant proteins among others [2–5].

HSPs or molecular chaperones are produced in all organisms in response to elevated temperatures and other stress conditions; its induction is correlated with the acquisition of thermotolerance [6–8]. HSPs are involved in a variety of cellular processes including protein folding, assembly of oligomeric proteins, transport of proteins across membranes, stabilization of polypeptide strands and membranes, and prevention of protein inactivation [8–10]. In addition, HSPs participate in regulating the activation and function of target proteins, although themselves are not components of the target proteins [10]. These proteins are classified in plants into five classes according to their molecular weight: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, and small HSP (sHSP) [9,11,12].

sHSPs constitute a family of structurally diverse and abundant HSPs synthesized by plants, usually undetectable under normal conditions but they can be induced by stress conditions and developmental stimuli [13]. The monomeric molecular mass of sHSPs ranges from 12–42 kDa, but in their native state the majority of sHSPs form homo- and hetero-oligomers of 12 to 32 subunits [14], although there are also dimeric and tetrameric sHSPs [12,15]. sHSPs are defined by a core α -crystalline domain of about 100 amino acids that is conserved in all plant sHSPs. This domain is responsible for dimer formation (sHSP-sHSP), which is enriched in β -strands organized in a β -sheet sandwich, the basic structural unit of many sHSPs [16]. Also, this α -crystalline domain is flanked by an *N*-terminal region highly variable in size and sequence that has been suggested as a candidate site for substrate binding. On the other hand, the *C*-terminal region is short and flexible, and it has been proposed as the site of contact that stabilizes the oligomeric structure [12,14,17]. In the *Arabidopsis thaliana* genome, at least 19 open reading frames (ORFs) encoding sHSPs have been identified [18]. These proteins are grouped into six classes, based on their intracellular localization, three sHSP classes (CI, CII and CIII) are localized in the cytosol or nucleus, and other classes in plastids (class P), in the endoplasmic reticulum

(class ER) and in the mitochondria (class M). In addition, a set of sHSP-like proteins have been described and grouped as: class CI related and class P related proteins [18].

Cactus pear (*Opuntia* spp.) is a perennial arborescent cactus widely distributed in the arid and semiarid regions of Mexico, where it plays a strategic role in subsistence agriculture. Cactus pear is edible as a fruit and vegetable, and is also used as forage crop and for medicinal purpose. *Opuntia* plants exhibit Crassulacean Acid Metabolism (CAM) photosynthesis, in which CO₂ exchange occurs at night, when the water vapor pressure difference between the air and the transpiring surfaces is lower, resulting in high water use efficiency [19]. These plants present several extraordinary morphological adaptations to reduce water loss, for example: the globular or racquet-like structures known as cladodes, which store large amounts of water, the replacement of leaves by thorns, thick cuticle cladode, low stomatal frequency, and sunken stomata [20,21]. Because of these adaptations and its tolerance to drought, this plant can cope with a variety of environmental conditions [22,23].

Recently, our group reported a cDNA library of *Opuntia streptacantha* cladodes containing a collection of ESTs accumulated under abiotic stress [24]. Among the genes involved in stress response obtained in this library, a small heat shock protein (sHSP) was identified. In the present study, we have approached the functional characterization of the *OpsHSP18* gene, encoding an 18.34 kDa sHSP, by analyzing a series of *Arabidopsis thaliana* over-expressing lines *35S::OpsHSP18*. Results reveal that *35S::OpsHSP18* over-expressing lines are tolerant to salt and osmotic stress, suggesting that OpsHSP18 protein has a role in plant abiotic stress tolerance.

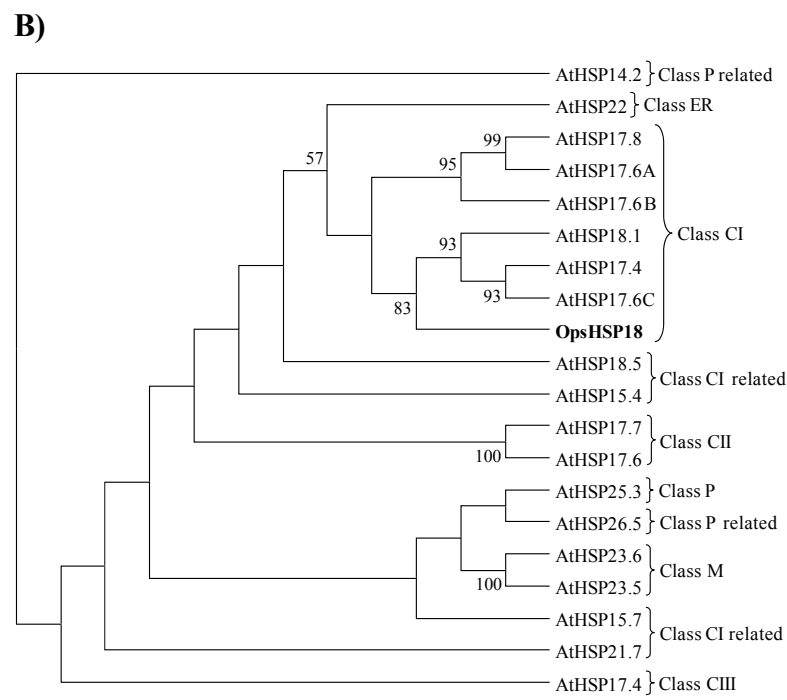
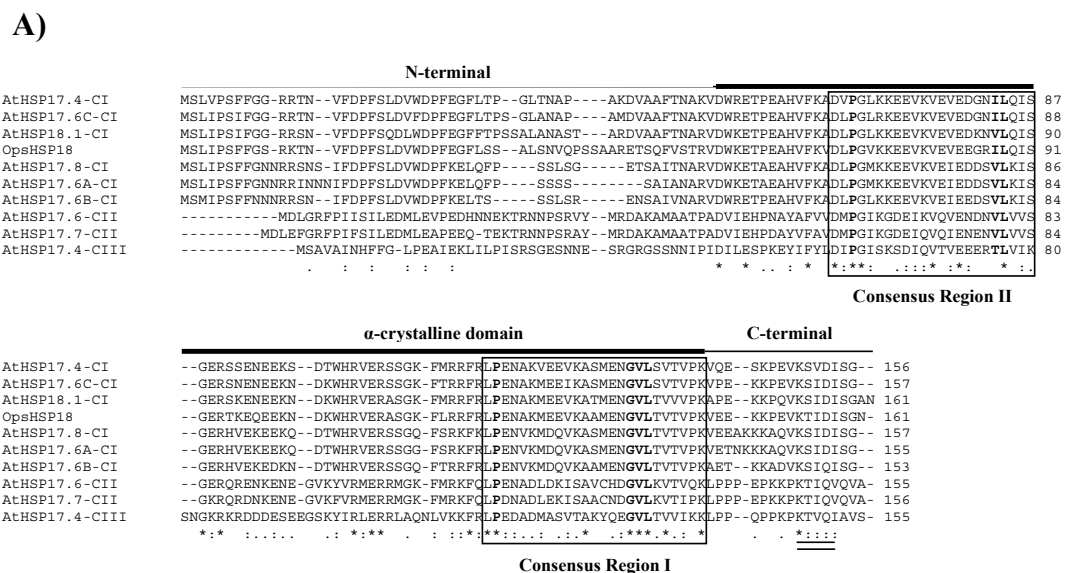
2. Results

2.1. The OpsHSP18 Gene Encodes a Small Heat Shock Protein (sHSP)

A full length cDNA sequence (802 bp, Accession No. HO058719) encoding a small heat shock protein (OpsHSP18) from *Opuntia streptacantha* was isolated from a cDNA library previously generated under stress conditions [24]. The cDNA sequence comprises a 5'-UTR region of 95 bp, a 3'-UTR region of 221 bp, and an open reading frame (ORF) of 486 bp encoding a polypeptide of 161 amino acids with a predicted molecular mass of 18.34 kDa and an isoelectric point (pI) of 5.85 (Figure S1). In addition, a genomic fragment containing the *OpsHSP18* gene plus 272 bp of promoter region was obtained by inverse PCR method (Figure S1). A canonical TATA-box was found at -30 bp of the +1 transcription start site. No intron sequences were found within the *OpsHSP18* gene (Figure S1).

The deduced amino acid sequence of the *O. streptacantha* OpsHSP18 protein and cytosolic class CI, CII, and CIII proteins from *A. thaliana* revealed characteristic features of plant sHSPs, such as typical α -crystalline domain (86 amino acids). This domain contains two consensus regions I and II (Figure 1A; boxed), separated by a hydrophilic region of variable length (Figure 1). The consensus regions present the Pro-X₍₁₄₎-Gly-Val-Leu and Pro-X₍₁₄₎-X-Val/Leu/Ile-Val/Leu/Ile motifs, in regions I and II (in bold), respectively. Both motifs are typical signatures of almost all plants sHSP (Figure 1A) [12,25,26]. Another conserved motif is basic-X-Ile/Val-X-Ile/Val, located in the C-terminal region and, suggested to be involved in the formation of oligomers of the plant sHSPs (Figure 1A; double underlined) [18,27].

Figure 1. (A) Amino acid sequence alignment of OpsHSP18 and cytosolic class CI, CII and CIII proteins from *A. thaliana*. Characteristic domains are indicated with lines: N-terminal, α -crystalline and C-terminal domains. Two consensus regions I and II (boxed) and a conserved sequence motif, basic-X-Ile/Val-X-Ile/Val (double underlined). Identical residues (asterisk) and conserved amino acid substitutions (dots) are indicated. **(B)** Unrooted phylogenetic tree of 19 small heat shock proteins of *A. thaliana* and the *O. streptocantha* OpsHSP18 protein. The phylogenetic tree was created by Neighbor-Joining method, PHYLIP 3.67 package [28]. Bootstrap support values out of 1000 pseudoreplicates of the data set, and are provided as percentages at the corresponding nodes when >50%. Proteins were grouped into six classes according to Scharf *et al.* [18]: class CI, CII and CIII (cytosolic/nucleus), class P (plastids), class ER (endoplasmic reticulum) and class M (mitochondria). sHSP-like proteins are indicated as: class CI related and class P related proteins.

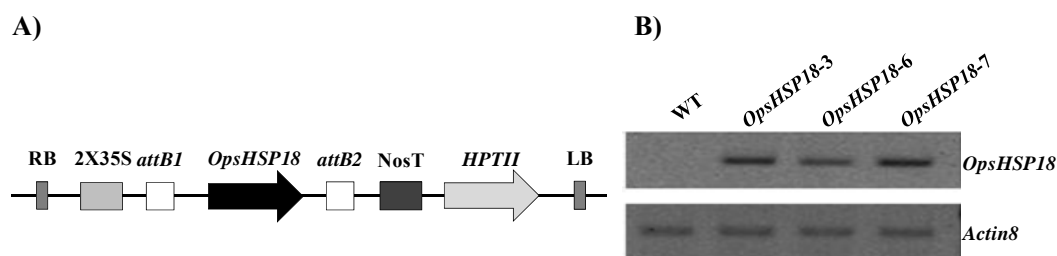


A phylogenetic tree was constructed with the OpsHSP18 protein and 19 sequences of *A. thaliana* sHSP proteins (14.2 to 26.5 kDa; Figure 1B). According to the phylogenetic tree, the OpsHSP18 protein is clustered with the *A. thaliana* cytosolic class CI sHSPs, mainly with AtHSP17.4 (At3g46230), AtHSP17.6C (At1g53540) and AtHSP18.1 (At5g59720) proteins (Figure 1B). Amino acid sequence alignments of the OpsHSP18 protein with orthologous cytosolic class CI sHSPs of other plant species shows high sequence identity, especially in α -crystalline domain (Figure S2). The OpsHSP18 protein shows 79.60% identity with the *Citrullus lanatus* CIHSP18.1A, 79.50% with the *Eucalyptus grandis* EgHSP18, 79.00% with the *Populus trichocarpa* PtHSP17.8, 78.50% with the *Vitis vinifera* VvHSP18.2, 77.30% with the *Medicago sativa* MsHSP18.2, 77.30% with the *A. lyrata* AIHSP18, and 75.30% with the *A. thaliana* AtHSP17.6C proteins.

2.2. OpsHSP18 Gene Is Involved in the Response to Abiotic Stress during Seed Germination

In order to elucidate the possible participation of *OpsHSP18* gene under stress conditions, *A. thaliana* over-expressing lines *35S::OpsHSP18-3*, *35S::OpsHSP18-6*, and *35S::OpsHSP18-7*, were generated (Figure 2A). The expression levels of *OpsHSP18* gene in Arabidopsis was determined by semi-quantitative RT-PCR, observing that all transgenic lines showed expression of the *OpsHSP18* gene, in comparison to control WT plants (Col-0), in which as expected, no expression was detected (Figure 2B).

Figure 2. (A) Schematic diagram of the OpsHSP18 construction in pMDC32 binary vector. RB right border for T-DNA integration, $2 \times 35S$ cauliflower mosaic virus (CaMV) promoter, *attB1* and *attB2* sites for recombination, OpsHSP18 (small heat shock protein 18) ORF from *Opuntia streptacantha*, NosT nopaline synthase (Nos) terminator region, *HPTII* hygromycin resistance gene, LB left border for T-DNA integration. (B) Detection of *OpsHSP18* transcript in *Arabidopsis thaliana* *35S::OpsHSP18-3*, -6, and -7 over-expressing lines by semi-quantitative RT-PCR. Total RNA was isolated from 15 day-old *A. thaliana* seedlings. One microgram of total RNA was used for RT-PCR analysis. *A. thaliana* *Actin8* gene was used as loading control.



To determine whether *OpsHSP18* gene plays a role in tolerance to salt stress, seeds of the WT and the over-expressing lines (*35S::OpsHSP18-3*, -6, and -7) were germinated on MS medium containing 0, 100, 125, 150, and 175 mM NaCl. The *35S::OpsHSP18-3*, -6, and -7 transgenic lines exhibited a higher percentage of germination than the WT at all salt concentrations tested (Figure 3). In particular, 6 days after germination on 150 mM NaCl there was a significant increase in the germination rate of *35S::OpsHSP18-3*, -6, and -7 over-expressing lines showing 57.50%, 51.25%, and 45.00%,

respectively, compared with 33.75% of the WT (Figure 3). Instead, no significant differences in germination rate between the transgenic lines and the WT were observed under control conditions (Figure 3). We also analyzed the percentage of green cotyledons 21 days after growth under salt stress (Figure 4A). The seedlings of the over-expressing lines (35S::*OpsHSP18-3*, -6, and -7) presented 55.00%, 41.25%, and 42.50% of green cotyledons, respectively, in comparison with 7.50% of green cotyledons in the WT at 100 mM NaCl (Figure 4A). As observed in the figure, transgenic seedlings were clearly more tolerant than the WT, showing enhanced growth under stress conditions.

Figure 3. Percentage of seed germination of *A. thaliana* Col-0 and 35S::*OpsHSP18-3*, -6, and -7 transgenic lines under salt stress treatments. Seeds were germinated with 0, 100, 125, 150, and 175 mM of NaCl and seed germination percentages were evaluated at 5, 6, 7, and 8 days of treatment. Bars represent the means \pm SE ($n = 20$) of four replicates. Different letters indicate significant differences between the WT and the three transgenic lines. One-way ANOVA was used to analyze the data ($p \leq 0.05$) and differences among treatments were explored through Tukey tests.

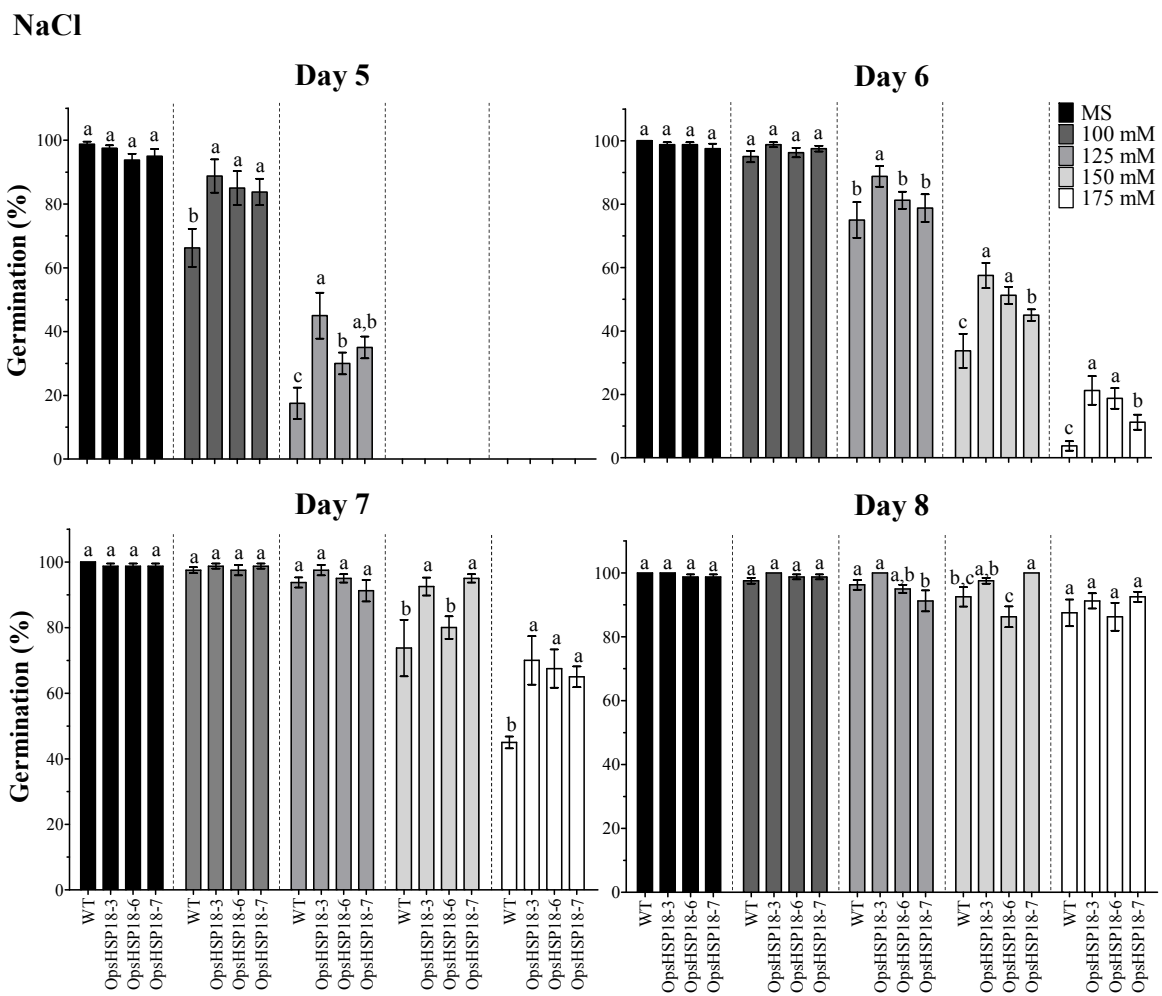
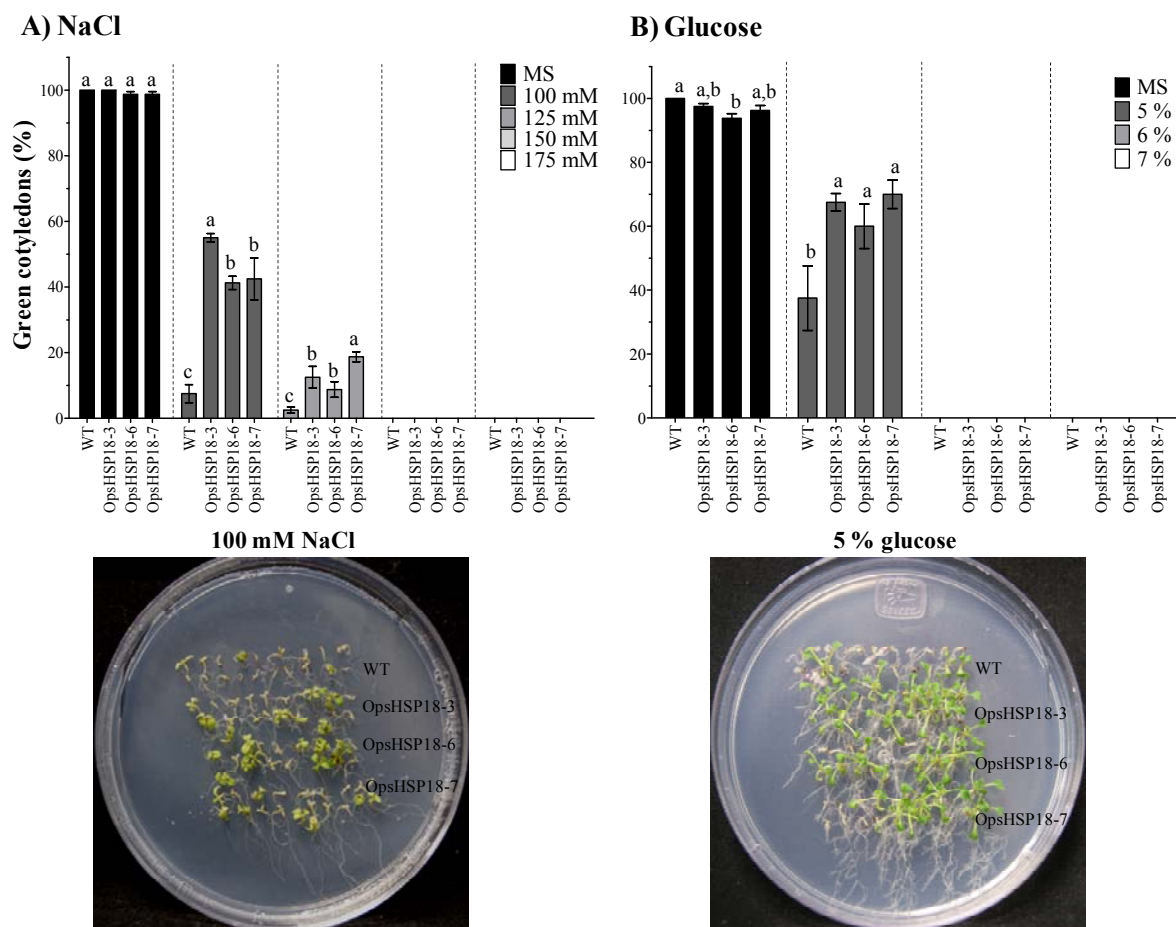


Figure 4. Percentage of green cotyledons in *A. thaliana* Col-0 and *35S::OpsHSP18-3*, -6, and -7 transgenic lines, under salt and osmotic stress treatments. Green cotyledons percentage was evaluated 21 days after seed germination on conditions of 0, 100, 125, 150, and 175 mM NaCl (A) and 0%, 5%, 6%, and 7% of glucose (B). Images of green cotyledons are shown for treatments of 100 mM NaCl, and 5% glucose at 21 days. Bars represent the means \pm SE ($n = 20$) of four replicates. Different letters indicate significant differences between the WT and the three transgenic lines. One-way ANOVA was used to analyze the data ($p \leq 0.05$) and differences among treatments were explored through Tukey tests.



Then seeds of *35S::OpsHSP18-3*, -6, and -7 over-expressing lines and of the WT were germinated in the presence of several glucose or mannitol concentrations (0%, 5%, 6%, and 7%). In Figure 5, the percentage of germination at 5 to 8 days of osmotic stress treatment is shown. In a similar way as described in the salt stress experiments, the over-expression of the *OpsHSP18* gene had a positive effect on *Arabidopsis* seed germination under sugar treatments. This effect was even more evident at the highest concentrations of glucose and mannitol, where all *35S::OpsHSP18* transgenic lines displayed accelerated seed germination as compared with the WT (Figure 5). The percentage of green cotyledons was estimated 21 days after germination under osmotic stress. It was noticed that all transgenic lines had a higher percentage of green cotyledons (*35S::OpsHSP18-3*: 67.50%, *35S::OpsHSP18-6*: 60.00%, and *35S::OpsHSP18-7*: 70.00%) than the WT (37.50%) in treatments with 5% of glucose (Figure 4B). As mentioned above for salt treatment, growth of transgenic lines under

glucose was more vigorous than the WT. In the case of 5% of mannitol, the development of the green cotyledons was arrested in both WT and over-expressing lines (*35S::OpsHSP18-3*, -6, and -7; data not shown).

Figure 5. Percentage of seed germination of *A. thaliana* Col-0 and *35S::OpsHSP18-3*, -6, and -7 transgenic lines under osmotic stress treatments. Seeds were treated with 0%, 5%, 6%, and 7% of glucose (A) and mannitol (B). These concentrations are equivalent to 0, 277, 333, 388 mM of glucose and 0, 274, 329, 383 mM of mannitol. Seed germination percentage was scored at 5, 6, 7, and 8 days of treatments. Bars represent the means \pm SE ($n = 20$) of four replicates. Different letters indicate significant differences between the WT and the three transgenic lines. One-way ANOVA was used to analyze the data ($p \leq 0.05$) and differences among treatments were explored through Tukey tests.

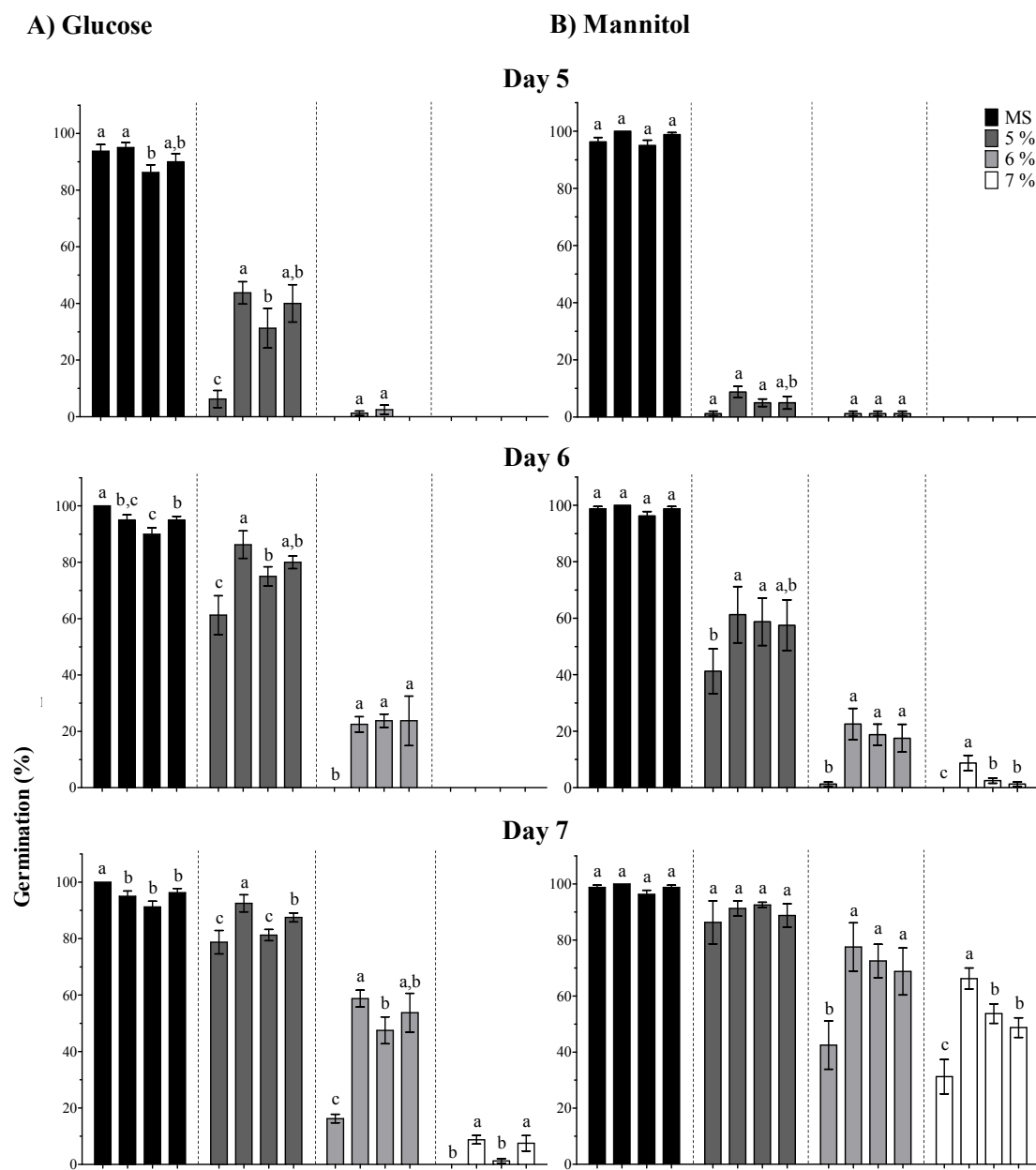
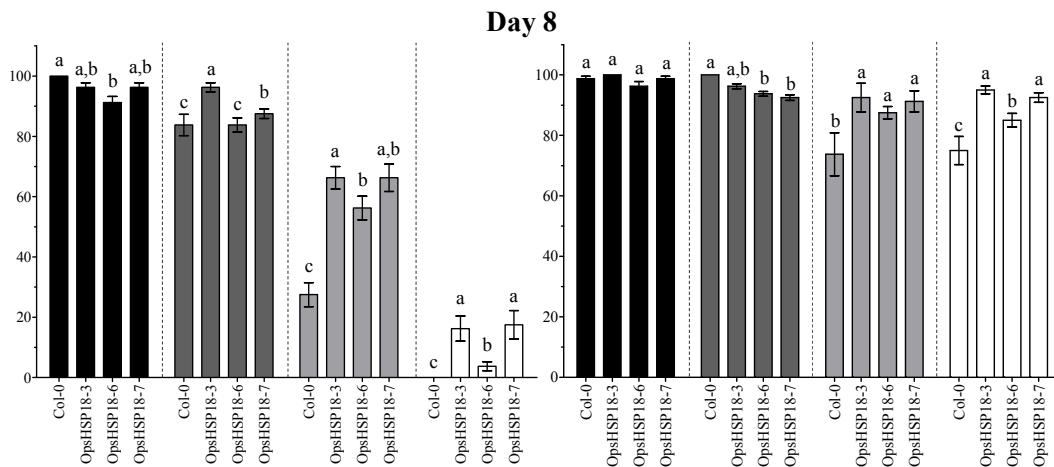


Figure 5. Cont.



Remarkably, *Arabidopsis* seeds over-expressing *OpsHSP18* gene show reduced sensibility to ABA (Figure 6). In particular, when the seeds were germinated in the presence of 9 μ M of ABA, the transgenic lines achieved more than 60.00% germination as compared to 30.00% of the WT at 10 days of treatment. On the other hand, at all concentrations (3, 5, 7, and 9 μ M) of ABA tested, the development of the green cotyledons was arrested in both WT and over-expressing lines (35S::*OpsHSP18*-3, -6, and -7; data not shown).

Figure 6. Effect of ABA on the percentage of seed germination of *A. thaliana* Col-0 and 35S::*OpsHSP18*-3, -6, and -7 transgenic lines. Abscisic acid (ABA) concentrations were of 0, 3, 5, 7, and 9 μ M. Seed germination percentage was evaluated at 8, 9, and 10 days of treatment. Bars represent the means \pm SE ($n = 20$) of four replicates. Different letters indicate significant differences between the WT and the three transgenic lines. One-way ANOVA was used to analyze data ($p \leq 0.05$) and differences among treatments were explored through Tukey tests.

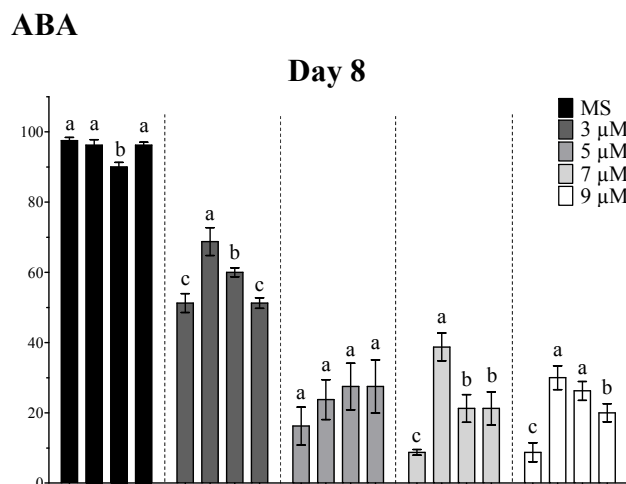
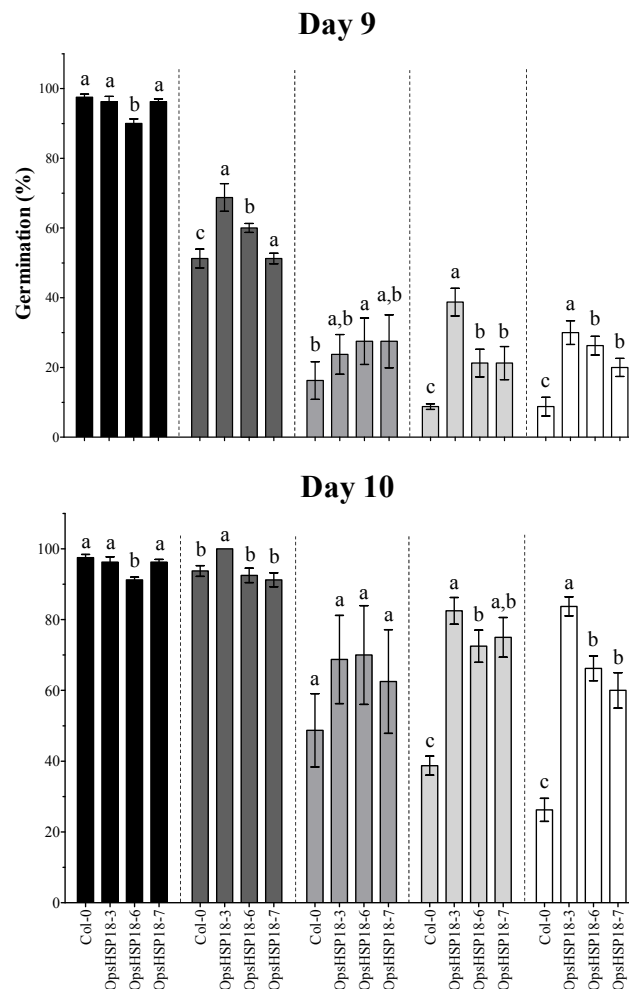


Figure 6. Cont.



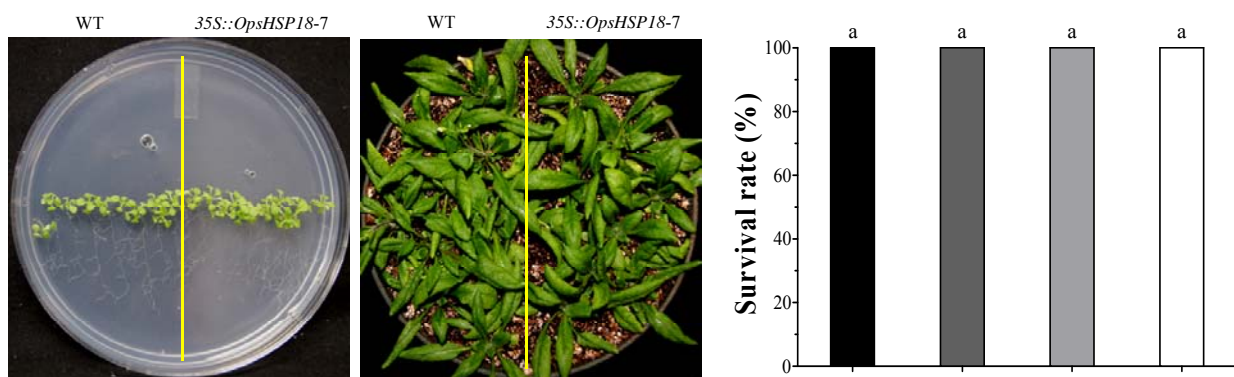
2.3. The Over-Expression of the OpsiHSP18 Gene Allows *A. thaliana* Transgenic Plants Recover from Abiotic Stress

To further characterize the response of the over-expressing lines (*35S::OpsiHSP18-3*, *-6*, and *-7*) to abiotic stress, salt and osmotic stress treatments were conducted at the seedling stage. Ten day-old seedlings (WT and over-expressing lines) were grown on MS medium containing 150 mM NaCl for 14 days (Figure 7B). When the seedlings of the WT and the transgenic lines were grown under control conditions no significant differences were observed (Figure 7A). However, under salt stress, leaves of the WT seedlings were more affected than those of the transgenic lines showing more symptoms of chlorosis (Figure 7B and Figure S3B). After salt stress treatment, plants were allowed to recover for 21 days in pots, and the percentage of survival was recorded (Figure 7B). We observed that the over-expressing lines *35S::OpsiHSP18-3* and *-7* exhibited three fold higher survival rates than control plants, and the over-expressing line *35S::OpsiHSP18-6* achieved two fold (Figure 7B). The same behavior was observed with 5% of mannitol, in which 10 day-old seedlings were grown on MS medium with the sugar for 21 days, and then plants were let to recover in pots for 21 days. Under this condition, the over-expressing lines *35S::OpsiHSP18-3* and *-7* showed the highest survival rates (Figure 7D). In contrast, when the seedlings were subjected to 7% of glucose for 21 days in MS medium and recovered, there were no differences between the over-expressing lines (*35S::OpsiHSP18-3*,

-6, and -7) and the control (Figure 7C). Our results suggest that over-expression of *OpsHSP18* gene in *Arabidopsis* plays an important role in germination under salt and osmotic stress, and also at the seedling stage, as part of the mechanisms of tolerance to abiotic stress conditions.

Figure 7. Survival rate of *Arabidopsis thaliana* Col-0 and *35S::OpsHSP18*-3, -6, and -7 transgenic lines after salt (NaCl) and osmotic (glucose and mannitol) treatments. Ten day-old seedlings were grown under: **A)** control conditions in MS medium for 21 days and, transferred to pots for 21 days; **B)** in Murashige and Skoog (MS) medium with 150 mM of NaCl for 14 days; **C)** in MS medium with 7% (388 mM) glucose, and **D)** with 5% (274 mM) mannitol during 21 days. After these stress periods, plants were transferred to pots, and survival rates of seedlings were evaluated at 21 days. Bars represent the means \pm SE ($n = 10$) of four replicates. Different letters indicate significant differences between the WT and the three transgenic lines. One-way ANOVA was used to analyze data ($p \leq 0.05$) and differences among treatments were explored through Tukey tests.

A) Control

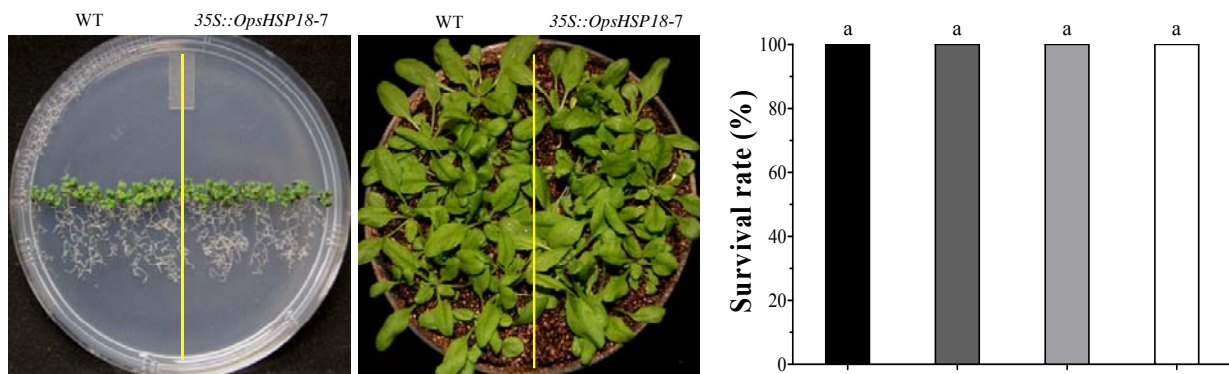


B) NaCl

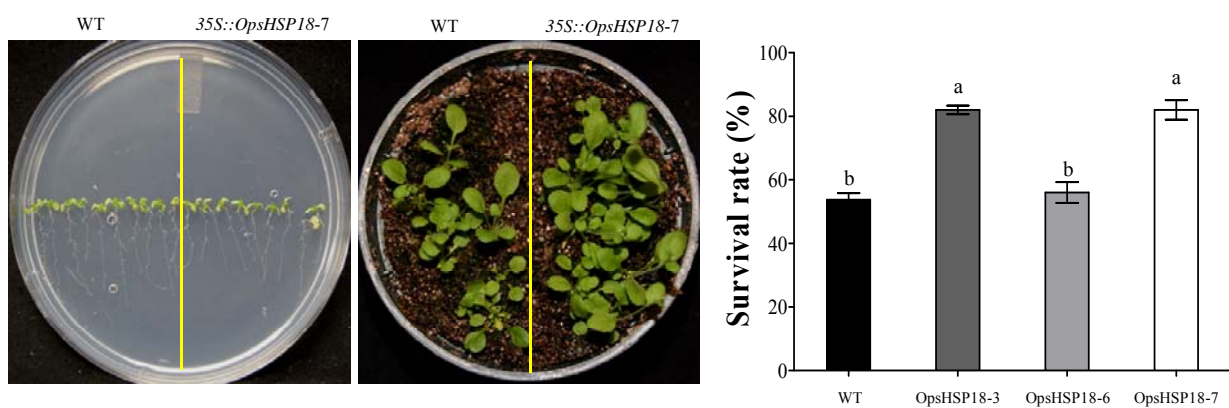


Figure 7. Cont.

C) Glucose

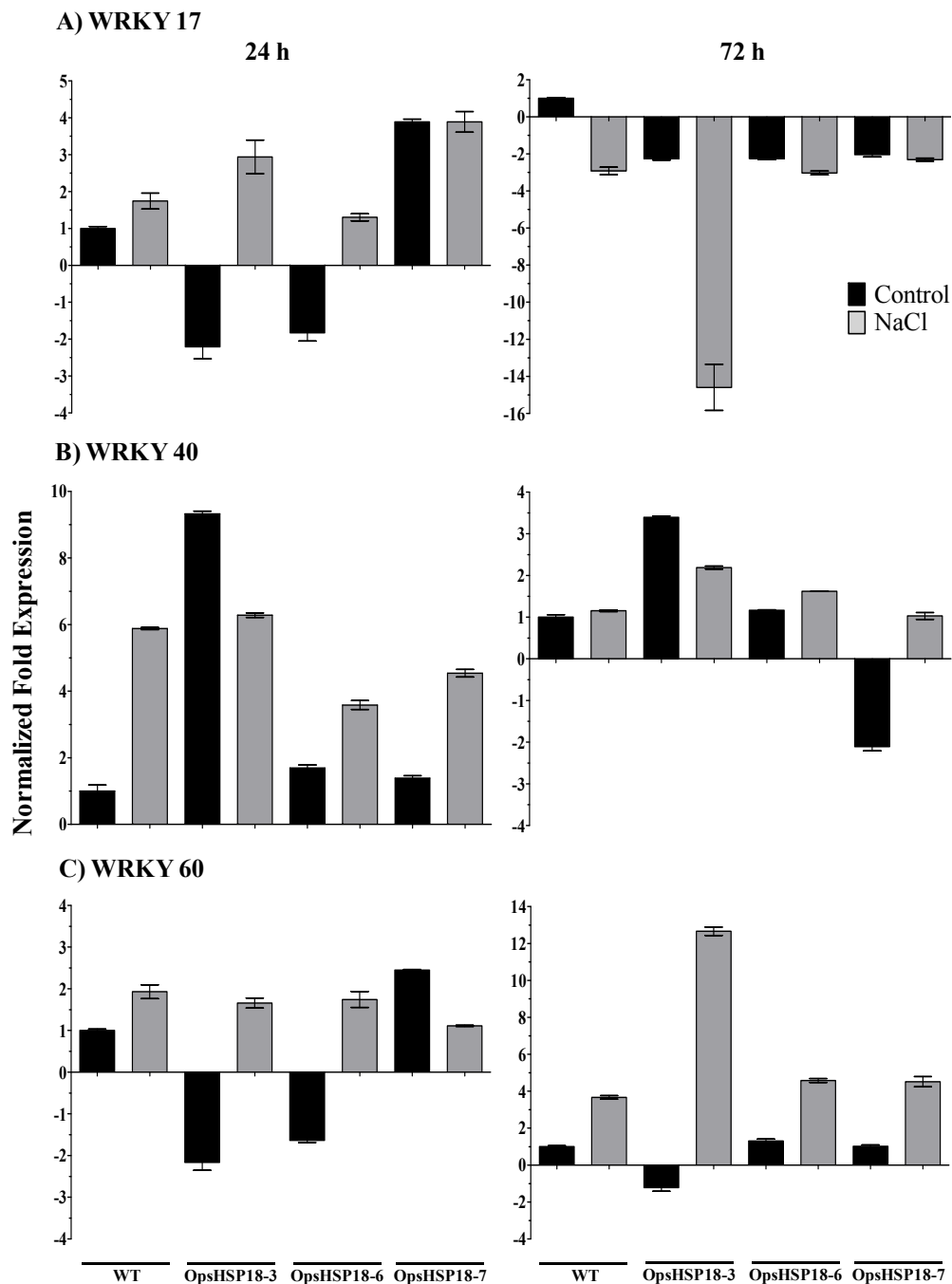


D) Mannitol

2.4. Expression of Stress Related Genes in the *A. thaliana* OpsHSP18 Transgenic Plants

There is evidence that WRKY transcription factors are involved in plant responses to abiotic stress. We selected the *WRKY-17*, *WRKY-40*, and *WRKY-60* transcription factors that are known to be induced by salt stress, to evaluate their expression levels by qRT-PCR. For this purpose, 10 day-old seedlings (WT and over-expressing lines) were grown on MS medium supplemented with 0 and 150 mM NaCl during 24 and 72 h. As shown in Figure 8, *WRKY-17* transcript was induced at 24 h of salt stress (gray bars) in both WT and transgenic lines, and repressed after 72 h (Figure 8A). *WRKY-17* induction was higher in the transgenic lines *35S::OpsHSP18-3* and *-6* under salt stress at 24 h (Figure 8A). Regarding *WRKY-40*, a notable induction was observed in WT plants subjected to salt stress, under this condition transgenic lines were less induced than the WT. The *35S::OpsHSP18-3* line was repressed at 24 and 72 h under salt stress (gray bars) in comparison to the condition without stress (black bars). At 72 h, transgenic lines maintained the same expression pattern shown at 24 h under salt stress, while the WT reached control levels (Figure 8B). On the other hand, *WRKY-60* transcript levels were induced at both 24 and 72 h of salt stress in both control and transgenic lines, the exception was the *35S::OpsHSP18-7* over-expressing line which was repressed at 24 h of stress (Figure 8C).

Figure 8. Expression levels of *WRKY* genes in *Arabidopsis thaliana* Col-0 and *35S::OpsHSP18-3*, -6, and -7 transgenic lines under salt stress. Expression levels of *WRKY-17*, *WRKY-40*, and *WRKY-60* genes were analyzed by qRT-PCR. Data were expressed as relative mRNA level compared with the WT plants without salt treatment, and were calculated after normalization to the *Arabidopsis Actin8* gene using the comparative threshold method. Control conditions (dark bars) and salt stress treatments (gray bars) at 24 and 72 h are shown for Col-0 and *35S::OpsHSP18-3*, -6, and -7 transgenic lines. Error bars were presented to indicate the standard error of the mean.



3. Discussion

Plants are sessile organisms, which are daily exposed to unfavorable conditions such as heat, cold, salt, drought, among others, which limit their growth and development. Processes such as seed germination, seedling growth and vigor, vegetative growth, flowering and fruit set are adversely affected by high salt concentration, ultimately causing diminished economic yield and also reduced quality of production [29]. Thus, plants have developed mechanisms such as the synthesis of heat shock proteins to adapt to those complex environments.

Recently, our research group generated a cDNA library from *Opuntia streptacantha* plants under abiotic stress conditions [24]. Among 329 unigenes of this cDNA library, 9% (29 unigenes) were involved in stress responsiveness, such as the heat shock proteins: HSP90, HSP70, HSP40, and sHSP. sHSPs are associated to the nuclei, cytoskeleton, and membranes, and they bind partially to denatured proteins, avoiding irreversible protein aggregation during stress conditions [16].

In this study, the small heat shock protein (OpsHSP18) was selected for functional characterization. Cactus pear OpsHSP18 protein displays characteristic features of the sHSP family, such as the α -crystalline domain, which has been reported to be involved in substrate binding and, in the interaction between the subunits of oligomeric complexes formed by sHSPs [30]. This domain is flanked by an *N*-terminal region of variable size and sequence, which has been proposed to have a role in unfolded substrate binding and specificity, and finally the *C*-terminal region which has been suggested to confer stability to the oligomeric structure [14].

In the *Arabidopsis thaliana* genome, 19 genes encoding sHSP proteins have been described and classified into six groups, the first three groups of sHSP belong to proteins that are located in the cytoplasm and nucleus (classes CI, CII, and CIII), and those located in mitochondria, plastids and endoplasmic reticulum (classes M, P, and ER, respectively) forming the remaining groups [18]. Thus, based on the alignments and phylogenetic analyzes, the *O. streptacantha* OpsHSP18 protein was grouped within class CI sHSP. Regarding Arabidopsis, it was shown that the AtHSP17.4, AtHSP18.1, and AtHSP17.6C proteins presented the highest percentage of identity with the cactus pear OpsHSP18 protein. Particularly, this conservation was found in the α -crystalline domain and the *C*-terminal region, while the *N*-terminal region of these sHSPs was the most variable.

Several studies have demonstrated that sHSPs play certain roles in plant development such as embryogenesis, seed maturation, seed imbibition and germination, pollen development and fruit maturation under normal and stress conditions [12,26,31–34].

In order to gain insight into the function of the *OpsHSP18* gene under abiotic stress, *A. thaliana* over-expressing lines were generated. When seed germination experiments were conducted under salt and osmotic stress, all three over-expressing lines exhibited higher germination percentages than the WT. Furthermore, over-expression of the cactus pear *OpsHSP18* gene shows a positive effect on seedling development under stress, in which, Arabidopsis seedlings displayed a greater number of green cotyledons under salt and glucose conditions. Thus, our data suggest that over-expression of *OpsHSP18* gene in *A. thaliana* might influence seed vigor under stressful germination conditions.

In general, plant reproductive organs are more sensitive to stress conditions than vegetative organs, so that class CI sHSP can facilitate either acquisition of desiccation tolerance, or they function in the rehydration mechanism of embryos during seed germination [33,35]. Wehmeyer in 1996 [31] found

that AtHSP17.4 and AtHSP17.6C proteins that belong to the class CI sHSP of Arabidopsis are expressed in seed maturation. In addition, the expression of *AtHSP17.4*, *AtHSP17.6C* and *AtHSP18.1* appear to be induced under heat stress conditions at temperatures of 35 or 40 °C for 2 h [36], and at 37 °C for 90 min [37]. AtHSP17.6 protein encodes a class CII sHSP from *A. thaliana*, it was detected in mid-maturation, being the transcript more abundant in dry seeds, and a rapid decline was reported 6 days after germination [38]. On the other hand, high levels of *AtHSP17.6A* transcripts accumulated in siliques along with acquisition of desiccation tolerance by seeds. *AtHSP17.6* (class CII) transcripts were less abundant than *AtHSP17.6A* transcripts in seeds, but a strong and transient induction of *AtHSP17.6* transcript (CII) was observed after imbibition [38]. This suggests a putative role of AtHSP17.6 (CII) in protecting proteins during rehydration, and a divergence in function between the two cytosolic AtHSP17.6 proteins.

Recently, the characterization of *NnHSP17.5* gene from *Nelumbo nucifera*, which encodes a cytoplasmic class CII sHSP was reported [34]. It was found that during seed germination the expression levels of *NnHSP17.5* declined rapidly within 3 d after imbibition, suggesting a role in early stages of seed germination. This gene was also found to be strongly regulated under heat and oxidative stress [34].

On the other hand, we found that the over-expression of *OpsHSP18* gene in Arabidopsis increases significantly the germination rate under ABA treatments compared with WT. It has been suggested that ABI3 transcription factor may be necessary to induce several sHSP during seed development [31,32]. Our data show an ABA insensitive phenotype, since the over-expressing lines are less affected in the germination process under ABA treatments than the WT. This observation opens new questions about the role of sHSP and ABA signaling.

In addition, the over-expression of *OpsHSP18* gene confers tolerance to salt and osmotic (mannitol) stress, increasing the survival rate of Arabidopsis transgenic lines after stress recovery. Differences in expression levels of the over-expressing lines were observed, in which a correlation between higher expression levels of lines *35S::OpsHSP18-3* and *-7*, and their tolerance to abiotic stress was obtained.

Different studies have shown that over-expression of *sHSPs* confer tolerance to stress conditions. In transgenic rice, the over-expression of the *sHSP17.7* gene confers tolerance to heat and UV-B [39], and drought stress [40]. *NnHSP17.5* over-expression in Arabidopsis transgenic plants showed an increase in the thermotolerance compared with WT plants at 40 °C for 60 or 75 min. The authors suggested that *NnHSP17.5* might play a protective role of proteins under stress conditions, such as superoxide dismutase (SOD), since SOD enzyme activity was found to be higher in transgenic lines than in WT plants [34]. Furthermore, over-expression of *NnHSP17.5* in Arabidopsis transgenic lines confers tolerance to heat, salinity, drought, and osmotic stress [34].

Finally, transcription factors play an important role in abiotic stress tolerance. In the last few years, changes in expression levels of some *WRKY* transcription factors (*WRKY-17*, *-18*, *-25*, *-33*, *-40*, and *-60*) have been described under salt stress [41,42]. In addition, some sHSP contain W-boxes on their promoter regions [43], suggesting the transcriptional activation of *sHSP* genes by *WRKY* transcription factors. We observed a notable induction of the transcription factors *WRKY-17*, *-40* and *-60* in the WT plants after 24 h of under salt stress. However, in the *35S::OpsHSP18* over-expressing lines, the expression level of these transcription factors was altered under stress. In particular, *WRKY-17* and *-60* were more induced in the *35S::OpsHSP18-3* line than in the WT under stress; perhaps one of the

mechanisms that lead stress tolerance in this line during germination under salt stress might be related to *WRKY* expression.

4. Experimental Section

4.1. Plant Material and Growth Conditions

Seeds of *Arabidopsis thaliana* Columbia ecotype (Col-0) and seeds of the *35S::OpsHSP18* over-expressing lines generated in this study (see below) were sterilized with 20% (v/v) commercial sodium hypochlorite (6% free chlorine) solution for 5 min, and rinsed five times in sterile distilled water. Aseptic seeds were germinated in plastic Petri dishes containing Murashige and Skoog (MS) 0.5× medium supplemented with 1.4% agar and 1.5% sucrose. Plates were kept at 4 °C for 3 days and then, incubated at 22 ± 2 °C for 10 days in a growth chamber under a 16 h light/8 h dark photoperiod. Plants were grown to maturity in soil pots in a growth chamber at 22 ± 2 °C with a 16 h light/8 h dark photoperiod.

4.2. Inverse Polymerase Chain Reaction (IPCR)

Genomic DNA was isolated from *O. streptacantha* seedlings using the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Then, 0.5 µg of genomic DNA were digested with 20 units of *EcoRI* at 37 °C, in an overnight incubation. The enzyme was then heat inactivated (75 °C for 20 min), and self-ligation of cohesive ends was conducted 16 °C (overnight incubation) with 0.2 units of T4 DNA ligase in a total volume of 100 µL. PCR was performed with 1 µL of the ligation mixture, 1 µL of InvFw*OpsHSP18* 5'-GATATCTCTGGGAACTAAAGGGG-3' and InvRv*OpsHSP18* 5'-AAAGAAGCTTGAATTAGCGAC-3' primers (20 µM each one), 10× Advantage 2 PCR buffer, 50× dNTPs (10 mM each one) and 1 unit of 50× Advantage 2 polymerase mix (Clontech, Mountain View, CA, USA) in a total volume of 50 µL. PCR conditions were as follows: 94 °C for 5 min; 94 °C for 2 min, 58 °C for 2 min, and 72 °C for 3 min (35 cycles); and 72 °C for 10 min. A second amplification was done using 1 µL of the previous PCR reaction. The PCR products were cloned into pCR[®]4-TOPO[®] vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and sequenced in the Macrogen Company (Seoul, Korea).

4.3. Generation of *Arabidopsis thaliana* Over-Expressing Lines

The ORF sequence (486 pb) of the *OpsHSP18* gene was amplified from a cDNA library of *O. streptacantha* cladodes generated under abiotic stress conditions using the primers Fw*OpsHSP18* 5'-ACCATGTCGCTAATTCCAAG-3' and Rv*OpsHSP18* 5'-CCTTTAGTTCCCAGAGATATC-3' [24]. The amplified PCR product was cloned into pCR[®]8/GW/TOPO[®] (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) entry vector, and subcloned into the pMDC32 expression vector by site-specific recombination using Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Then, the construct was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* GV2260 strain by electroporation and, was introduced into *A. thaliana* Col-0 plants by floral dip method [44]. Transgenic lines carrying the *OpsHSP18* gene (*35S::OpsHSP18*) were selected on MS 0.5× medium containing hygromycin 50 mg/mL. The T2 generation of transgenic plants was transferred into soil pots and grown in growth chambers under

controlled conditions to produce seeds. Homozygous transgenic lines (T3) were used for subsequent analysis of seed germination and tolerance assays under abiotic stress conditions.

4.4. RNA Isolation, RT-PCR and Real-Time qRT-PCR Analyses

Total RNA was isolated from leaves of *A. thaliana* Col-0 (WT) and *35S::OpsHSP18* transgenic plants, using the Concert™ Plant RNA Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. cDNA synthesis were performed using the SuperScript™ First Strand Synthesis System for reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. One microliter of the RT reaction was used as template for PCR assays to amplify the *OpsHSP18* gene using the following primers: Fw*OpsHSP18* 5'-ACCATGTCGCTAATTCCAAG-3' and Rv*OpsHSP18* 5'-CCTTTAGTTCCCAGAGATATC-3'. As loading control, the *A. thaliana Actin8* (At1g49240) transcript was amplified using the Fw*Act* 5'-GCCAGTGGTTCGTACAACCG-3' and Rv*Act* 5'-CACGACCAGCAAGGTCGAGACG-3'. PCR amplifications were performed in 25 µL reaction mixtures containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 3.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 0.2 µM each primer, 2.5 U Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and 1 µL RT reaction as template. The amplifications were carried out with different numbers of cycles to ensure a linear response in the PCR reaction. Amplification conditions for both genes were as follows: 5 min at 94 °C followed by 28–30 cycles (depending on the transcript) of 30 s at 94 °C; 45 s at 58 °C; 45 s at 72 °C; and 5 min at 72 °C. PCR analyses were repeated twice, using 3 biological replicates, obtaining similar results. Regarding real-time RT-PCR, experiments were performed in a 10 µL reaction mixture made up of 5 µL of Power SYBR® Green RT-PCR Mix (2×), 200 nM of each oligonucleotide, 50 ng of RNA template and 0.08 µL of RT Enzyme Mix (125×) for one-step RT-PCR following manufacturer's suggestions (Applied Biosystems), and using the StepOne Real-Time PCR Detection System and StepOne Software v2.1 (Applied Biosystems). The thermal cycling conditions consisted of 30 min at 48 °C (cDNA synthesis), 10 min at 95 °C (activation of AmpliTaq Gold® DNA polymerase), followed by 40 cycles for PCR cycling of 15 s at 95 °C for denature and anneal/extend of 1 min at 60 °C. For each sample, two biological replicates ($n = 2$) were analyzed with their respective technical replicates. Quantification of *WRKY-17* (At2g24570), -40 (At1g80840) and -60 (At2g25000) gene expression was based on a cycle threshold value and transcript data were normalized to the *Actin8* (At1g49240) gene values. Relative expression levels of *WRKY-17*, -40, and -60 in WT and the overexpressing lines with or without salt treatments, were calculated based on corresponding levels in WT plants without salt treatment. Absence of contaminant genomic DNA was confirmed by reactions in which no RT Enzyme Mix reverse transcriptase was added, and with primers for the *Actin8* gene which were designed in flanking exons. The primers used were: Fw*WRKY17* 5'-GAGAAATAGAGGGGTTGGTTTTG-3' and Rv*WRKY17* 5'-CATCATTTTCTTACATGACACCAC-3' for *WRKY-17* transcript, Fw*WRKY40* 5'-AAATCAGCCCTCCCAAGAAACG-3' and Rv*WRKY40* 5'-CTTCACGACAGTCTCTTCTCTC TGC-3' for *WRKY-40* transcript, and Fw*WRKY60* 5'-GGTGGGCTTGAACCAGTTGAGG-3' and Rv*WRKY60* 5'-AATCTCCCGGAAATAGCAGTCG-3' for *WRKY-60* transcript.

4.5. Germination Assays under Stress and Hormone Treatments

Seeds of *A. thaliana* ecotype Col-0 and of the *35S::OpsHSP18* over-expressing lines (T3) were germinated under different stress conditions and in presence of the phytohormone abscisic acid (ABA). The effect of salt stress on germination was evaluated on MS 0.5× medium supplemented with 0, 100, 125, 150, and 175 mM NaCl. The effect of osmotic stress on germination was assessed on MS 0.5× medium without sucrose and supplemented with glucose (0, 277, 333, and 388 mM) or mannitol (0, 274, 329, and 383 mM). These concentrations were equivalent to 0%, 5%, 6%, and 7% of each sugar [45]. In addition, seeds were germinated in presence of different concentrations of ABA (0, 3, 5, 7, and 9 μM). The germination assays were carried out using 20 seeds of the control (Col-0) and of the transgenic lines (*35S::OpsHSP18*-3, -6, and -7) per treatment. Data are mean ± SE ($n = 20$) from four biological replicates. The seeds were regarded as germinated when the radicle emerged from the seed coat. In addition, green cotyledon number was scored after 21 days of NaCl, glucose, mannitol and ABA treatments.

4.6. Estimation of Seedling Survival Rates under Stress Treatments

Seeds of *A. thaliana* Col-0 and of the *35S::OpsHSP18*-3, -6, and -7 transgenic lines (T3 homozygous lines) were germinated *in vitro* in MS 0.5× Petri dishes in a growth chamber (22 ± 2 °C; 16 h light/8 h dark photoperiod). Subsequently, 10 day-old seedlings (ten plants of WT and ten plants of each one of the transgenic lines) were transferred to MS 1× medium supplemented with 0 and 150 mM NaCl for 14 days. In addition, for osmotic stress assays, seedlings were grown on MS 1× plates (without sucrose) containing 388 mM (7%) and 274 mM (5%) of glucose and mannitol, respectively, for 21 days. After these periods of saline and osmotic stress, the seedlings were transferred to pots, grown under controlled conditions (22 ± 2 °C; 16 h light/8 h dark photoperiod) and irrigated every 3 days, to observe post-stress recovery. The survival rate of plants was calculated by counting the number of plants that survived in each pot, after a period of 21 days. Data are mean ± SE ($n = 10$) from five biological replicates. The phenotype of each line was documented photographically.

4.7. In Silico Analysis of the OpsHSP18 Protein

The molecular weight and the isoelectric point of the OpsHSP18 protein was predicted using the Compute pI/Mw tool of the ExPasy proteomics server at the Swiss Institute of Bioinformatics [46]. The search of homologous sequences of the OpsHSP18 protein were conducted using the blast and keyword search tools in the Phytozome database [47] and the BLAST program (BlastN and BlastX) in two databases (GenBank non-redundant (nr) and EST) of the National Center for Biotechnology Information [48]. Putative protein domains were identified using the Motif Scan tool [49] at the ExPasy proteomics server. Multiple protein sequence alignments were carried out using the CLUSTAL W and the T-Coffee programs at the European Bioinformatics Institute [50]. The phylogenetic tree was created by Neighbor joining method using the application of the PHYLIP (Phylogeny Inference Package) 3.67 package [28]. For this, the amino acid sequences of the OpsHSP18 protein and the 19 sHSPs of *A. thaliana* [18] were aligned using MUSCLE version 4.0 version of the EBI database using default values. Then, the aligned sequences were subjected to re-sampling with replacement

(1000 bootstrap) using the Seqboot program of PHYLIP package and a distance matrix was calculated with Protdist program using the Henikoff/Tillier [51]. Probability Matrix from Blocks (PMB). The resultant matrices were transformed into multiple trees by the Neighbor program and summarized by the program Consense (both programs of the PHYLIP 3.67 package). The majority rule consensus tree was edited with the MEGA version 5.0 program [52].

4.8. Statistical Analysis

The data of seed germination and survival experiments of WT and *35S::OpsHSP18-3*, -6, and -7 transgenic lines (T3) were evaluated by One-way ANOVA analysis and Tukey test using GraphPad Software. The data are presented as the mean \pm standard error. Differences at $p \leq 0.05$ were considered significant.

5. Conclusions

The enhanced stress tolerance of *35S::OpsHSP18* Arabidopsis lines reveals that OpsHSP18 might have an important role in germination and seedling survival under salt and osmotic stress. In addition, the ABA insensibility phenotype of the *35S::OpsHSP18* lines reveals its importance in the germination process. Although the mechanism of action of sHSP is not yet clear, the functional characterization of OpsHSP18 provides new insights into abiotic stress responses mediated by chaperons.

Acknowledgments

This work was supported by the FOMIX-San Luis Potosi (FMSLP-2008-CO1-86781) and CONACYT (Investigación Ciencia Básica 2008-103106) fundings.

References

1. Mahajan, S.; Tuteja, N. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch. Biochem. Biophys.* **2005**, *444*, 139–158.
2. Cushman, J.C.; Bohnert, H.J. Genomic approaches to plant stress tolerance. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2000**, *3*, 117–124.
3. Zhu, J.K. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2002**, *53*, 247–273.
4. Wang, W.; Vinocur, B.; Altman, A. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **2003**, *218*, 1–14.
5. Bartels, D.; Sunkar, R. Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **2005**, *24*, 23–58.
6. Becker, J.; Craig, E.A. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Rev. Eur. J. Biochem.* **1994**, *219*, 11–23.
7. Parsell, D.A.; Lindquist, S. The function of heat -shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu. Rev. Genet.* **1993**, *27*, 437–496.
8. Vierling, E. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1991**, *42*, 579–620.

9. Wang, W.; Vinocur, B.; Shoseyov, O.; Altman, A. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* **2004**, *9*, 244–252.
10. Xue, Y.; Peng, R.; Xiong, A.; Li, X.; Zha, D.; Yao, Q. Over-expression of heat shock protein gene hsp26 in *Arabidopsis thaliana* enhances heat tolerance. *Biol. Plant* **2010**, *54*, 105–111.
11. Vierling, E. The small heat shock proteins in plants are members of an ancient family of heat induced proteins. *Acta Physiol. Plant* **1997**, *19*, 539–547.
12. Waters, E.R.; Lee, G.J.; Vierling, E. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* **1996**, *47*, 325–338.
13. Sun, W.; Montagu, M.V.; Verbruggen, N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *BBA-Gene Struct. Expr.* **2002**, *1577*, 1–9.
14. Vierling, E.; Jaya, N.; Garcia, V. Substrate binding site flexibility of the small heat shock protein molecular chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 15604–15609.
15. Stamler, R.; Kappe, G.; Boelens, W.; Slingsby, C. Wrapping the α -crystallin domain fold in a chaperone assembly. *J. Mol. Biol.* **2005**, *353*, 68–79.
16. Sun, Y.; MacRae, T.H. Small heat shock proteins: Molecular structure and chaperone function. *Cell Mol. Life Sci.* **2005**, *62*, 2460–2476.
17. Haslbeck, M.; Franzmann, T.; Weinfurter, D.; Buchner, J. Some like it hot: The structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2005**, *12*, 842–846.
18. Scharf, K.D.; Siddique, M.; Vierling, E. The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing α -crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress Chaperon.* **2001**, *6*, 225–237.
19. Winter, K.; Aranda, J.; Holtum, J.A.M. Carbon isotope composition and water-use efficiency in plants with crassulacean acid metabolism. *Funct. Plant Biol.* **2005**, *32*, 381–388.
20. Nobel, P.S.; Bobich, E.G. Initial net CO₂ uptake responses and root growth for a CAM community placed in a closed environment. *Ann. Bot.* **2002**, *90*, 593–598.
21. Rabas, A.R.; Martin, C.E. Movement of water from old to young leaves in three species succulents. *Ann. Bot.* **2003**, *92*, 529–536.
22. Cushman, J.C. Crassulacean Acid Metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiol.* **2001**, *127*, 1439–1448.
23. Luttge, U. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM). *Ann. Bot.* **2004**, *93*, 629–652.
24. Ochoa-Alfaro, A.E.; Rodríguez-Kessler, M.; Pérez-Morales, M.B.; Delgado-Sánchez, P.; Cuevas-Velazquez, C.L.; Gómez-Anduro, G.; Jiménez-Bremont, J.F. Functional characterization of an acidic SK3 dehydrin isolated from an *Opuntia streptacantha* cDNA library. *Planta* **2012**, *235*, 565–557.
25. Assab, E.; Rampino, P.; Mita, G.; Perrotta, C. Heat shock response in olive (*Olea europaea* L.) twigs: Identification and analysis of a cDNA coding a class I small heat shock protein. *Plant Biosyst.* **2011**, *145*, 419–425.
26. Mahmood, T.; Safdar, W.; Abbasi, B.H.; Naqvi, S.M.S. An overview on the small heat shock proteins. *Afr. J. Biotechnol.* **2010**, *9*, 927–949.
27. De Jong, W.W.; Caspers, G.J.; Leunissen, J.A.M. Genealogy of the α -crystallin small heat-stress superfamily. *Int. J. Biol. Macromol.* **1998**, *22*, 151–162.

28. Felsenstein, J. PHYLIP-phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics* **1989**, *5*, 164–166.
29. Sairam, R.K.; Tyagi, A. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci.* **2004**, *86*, 407–421.
30. Kim, K.K.; Kim, R.; Kim, S.H. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* **1998**, *394*, 595–599.
31. Wehmeyer, N.; Hernandez, L.D.; Finkelstein, R.R.; Vierling, E. Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol.* **1996**, *112*, 747–757.
32. Wehmeyer, N.; Vierling, E. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol.* **2000**, *122*, 1099–1108.
33. Volkov, R.A.; Panchuk, I.I.; Schöffl, F. Small heat shock proteins are differentially regulated during pollen development and following heat stress in tobacco. *Plant Mol. Biol.* **2005**, *57*, 487–502.
34. Zhou, Y.; Chen, H.; Chu, P.; Li, Y.; Tan, B.; Ding, Y.; Tsang, E.W.T.; Jiang, L.; Wu, K.; Huang, S. NnHSP17.5, a cytosolic class II small heat shock protein gene from *Nelumbo nucifera*, contributes to seed germination vigor and seedling thermotolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Cell Rep.* **2012**, *31*, 379–389.
35. Neta-Sharir, I.; Isaacson, T.; Lurie, S.; Weissa, D. Dual role for tomato heat shock protein 21: Protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. *Plant Cell* **2005**, *17*, 1829–1838.
36. Takahashi, T.; Komeda, Y. Characterization of two genes encoding small heat-shock proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.* **1989**, *219*, 365–372.
37. Helm, K.W.; Vierling, E. An *Arabidopsis thaliana* cDNA clone encoding a low molecular weight heat shock protein. *Nuc. Acids Res.* **1989**, *17*, 7995.
38. Sun, W.; Bernard, C.; van de Cotte, B.; Montagu, M.; Montagu, M.V.; Verbruggen, N. At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in Arabidopsis, can enhance osmotolerance upon overexpression. *Plant J.* **2001**, *27*, 407–415.
39. Murakami, T.; Matsuba, S.; Funatsuki, H.; Kawaguchi, K.; Saruyama, H.; Tanida, M.; Sato Y. Over-expression of a small heat shock protein, sHSP17.7, confers both heat tolerance and UV-B resistance to rice plants. *Mol. Breed.* **2004**, *13*, 165–175.
40. Sato, Y.; Yokoya, S. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell* **2008**, *27*, 329–334.
41. Jiang, Y.; Deyholos, M.K. Comprehensive transcriptional profiling of NaCl-stressed Arabidopsis roots reveals novel classes of responsive genes. *BMC Plant Biol.* **2006**, *6*, 1–20.
42. Chen, H.; Lai, Z.; Shi, J.; Xiao, Y.; Chen, Z.; Xu, X. Roles of arabidopsis WRKY18, WRKY40 and WRKY60 transcription factors in plant responses to abscisic acid and abiotic stress. *BMC Plant Biol.* **2010**, *10*, 1–15.
43. Zahur, M.; Maqbool, A.; Irfan, M.; Barozai, M.Y.K.; Qaiser, U.; Rashid, B.; Husnain, T.; Riazuddin, S. Functional analysis of cotton small heat shock protein promoter region in response to abiotic stresses in tobacco using *Agrobacterium*-mediated transient assay. *Mol. Biol. Rep.* **2009**, *36*, 1915–1921.

44. Zhang, X.; Henriques, R.; Lin, S.S.; Niu, Q.W.; Chua, N.H. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat. Prot.* **2006**, *1*, 641–646.
45. Zhao, Y.; Wang, T.; Zhang, W.; Li, X. SOS3 mediates lateral root development under low salt stress through regulation of auxin redistribution and maxima in *Arabidopsis*. *New Phytol.* **2011**, *189*, 1122–1134.
46. Swiss Institute of Bioinformatics. Available online: www.isb-sib.ch (accessed on 1 December 2011).
47. Phytozome database. Available online: www.phytozome.net (accessed on 10 December 2011).
48. National Center for Biotechnology Information. Available online: www.ncbi.nlm.nih.gov (accessed on 10 December 2011).
49. Motif Scan tool at the ExPasy proteomics server. Available online: http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan (accessed on 1 December 2011).
50. T-Coffee programs at the European Bioinformatics Institute. Available online: www.ebi.ac.uk (accessed on 10 December 2011).
51. Veerassamy, S.; Smith, A.; Tillier, E.R.M. A transition probability model for amino acid substitutions from blocks. *J. Comp. Biol.* **2003**, *10*, 997–1010.
52. Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* **2011**, *28*, 2731–2739.

© 2012 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

4.2 Identificación de posibles interactores de la proteína OpsHSP18 mediante el sistema de doble híbrido “Split-ubiquitin”

A pesar de la importancia de las HSP, aún se desconocen los posibles sustratos que protegen estas chaperonas sHSP. De esta manera, para identificar proteínas interactoras de la proteína OpsHSP18, se empleó el sistema de doble híbrido en levadura conocido como “Split-ubiquitin” (DUALhunter kit, Dualsystems Biotech). Este sistema consiste en fusionar la proteína de interés (anzuelo o “bait”) al N-terminal de una proteína pequeña de anclaje de membrana (Ost4 proteína de la levadura), y al C-terminal a un cassette reportero compuesto por un fragmento del C-terminal de la ubiquitina (Cub) unido al factor de transcripción (LexA-VP16). Una segunda proteína (presa o “prey”), en este caso la biblioteca de cDNA de *A. thaliana*, se fusiona a un fragmento N-terminal de la ubiquitina mutada (NubG; el cual tiene una sustitución de una isoleucina por una glicina en la posición 3, reduciendo la afinidad entre Cub y NubG). La interacción entre el “bait” y el “prey”, obligan a NubG y Cub a entrar en contacto, resultando en la reconstitución del “Split-ubiquitin”. El “Split-ubiquitin” es reconocido por proteasas específicas de la ubiquitina que cortan la cadena de polipéptidos entre Cub y LexA-VP16. De esta manera, el factor de transcripción es liberado y es translocado al núcleo, donde activa la transcripción de los genes reporteros (HIS3, ADE2 y LacZ; Fig. 12A). Para la construcción del vector “bait”, fueron diseñados oligonucleótidos con sitios de corte para la enzima *Sfi1*, con la finalidad de ligar el producto de PCR de manera dirigida al vector pDHB1. Los sitios de *Sfi1* en el vector pDHB1 del sistema DUALhunter son GGCCATTA´CGGCC y GGCCGCCT´CGGCC, permitiendo que los fragmentos digeridos sean ligados en la orientación correcta. Posteriormente se transformó la construcción *pDHB1-OpsHSP18* en células competentes de *Escherichia coli* TOP10, y después en células de *Saccharomyces cerevisiae* NMY51 (Dualsystems Biotech, 2007) y mediante PCR de colonia se confirmó la presencia del vector “bait” en levadura (Fig. 12B).

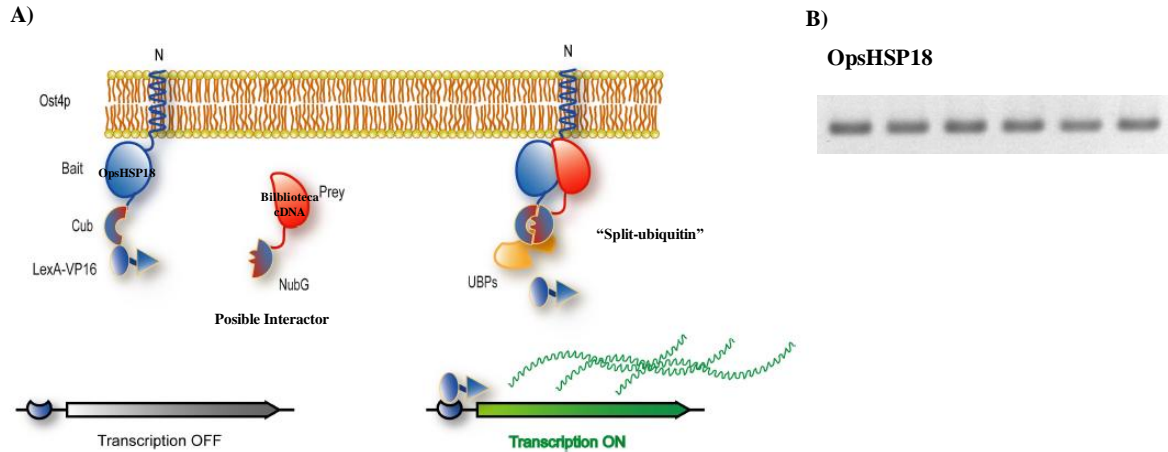


Figura 12. Sistema de dos híbridos “split-ubiquitin” de *Saccharomyces cerevisiae*. A) Interacción entre “bait” y el “prey”, obligan a NubG y Cub a entrar en contacto, resultando en la reconstitución del “split-ubiquitin”. El “split-ubiquitin”, es inmediatamente reconocido por proteasas (UBPs) específicas a la ubiquitina, cortan la cadena polipeptídica entre Cub y LexA-VP16. Entonces el factor de transcripción es liberado y es translocado al núcleo, donde activa la expresión de genes reporteros. B) PCR de colonia del gen *OpsHSP18* en *S. cerevisiae*, seleccionadas al azar.

Actualmente, se está verificando que la cepa de levadura que esta transformada con el plásmido *pDHB1-OpsHSP18* “bait”, se exprese correctamente en la levadura y que por consiguiente pudiera interactuar con otras proteínas que se encuentren en el vector “prey”. La construcción *pDHB1-OpsHSP18* se co-transformará con el control positivo, que es el plásmido pAl-Alg5 fusionada a la porción silvestre N-terminal de la ubiquitina (Nubl), la cual resultará en la reconstitución de la ubiquitina, aun cuando la proteína de interés y Alg5 no interactúen, ya que Nubl tiene una fuerte afinidad por Cub del vector bait, y por ende la activación de los genes reporteros. Como control negativo se utilizará el plásmido pDL2-Alg5 que presenta la porción N-terminal de la ubiquitina mutada (NubG), esperando una interacción débil por lo que no se activarían los genes reporteros. A partir, de estos datos podríamos inferir que la construcción anzuelo *pDHB1-OpsHSP18* se está expresando en la orientación correcta en la membrana de la levadura y que la construcción *pDHB1-OpsHSP18* es funcional en el sistema.

V. CAPITULO 2. AtDjA2 y AtDjA3 de *Arabidopsis thaliana*

En un trabajo previo Hernández-Lucero (tesis doctoral 2009; Hernández-Lucero y col., 2013), reportó una biblioteca de cDNA sustractiva en el cultivar de frijol Pinto Villa, el cual es tolerante al estrés por sequía y salinidad (Acosta-Gallegos, 1995; Jiménez-Bremont y col., 2006; Hernández-Lucero y col., 2008), esto con la finalidad de entender cómo los genotipos considerados como tolerantes, responden al estrés, y de esta manera identificar y aislar genes que son claves para establecer programas de mejoramiento genético de los cultivos importantes para el consumo humano (Graham y Ranalli, 1997; Recchia y col., 2013).

Para la construcción de la biblioteca de cDNA sustractiva, las plantas de frijol de la variedad Pinto Villa de 30 días de edad fueron tratadas con 0 y 200 mM de NaCl durante 2 y 5 días, el RNA se extrajo de hojas, tallos y raíz. De los 67 unigenes que se obtuvieron, se agruparon en 10 categorías: señalización, transcripción, transporte, mantenimiento celular y desarrollo, fotosíntesis y cloroplasto, fotorespiración, de respuesta a estrés y otros (Hernández-Lucero y col., 2013).

De los unigenes clasificados de respuesta a estrés, se seleccionó el unigen SSHPv-S38, que codifica para una proteína J que pertenece a la familia de las proteínas de choque térmico con un peso de 40 kDa (HSP40). Por consiguiente, como en frijol solo contábamos con una secuencia parcial del cDNA de dicho gen, se planteó el objetivo de estudiar y caracterizar los genes ortólogos At5g22060 (*AtDjA2*) y At3g44110 (*AtDjA3*) de *Arabidopsis thaliana*, que codifican para las proteínas J, ambas proteínas pertenecen al grupo Tipo I ó A, ya que presentan los dominios característicos de las proteínas J, tales como el dominio J, región rica en glicina y fenilalanina (G/F), dominio dedo de zinc y la región C-terminal. El gen *AtDjA2* codifica para una proteína de 419 aa, y respecto al gen *AtDjA3*, de forma interesante, se han reportado dos versiones de splicing, el primer transcrito *AtDjA3.1* codifica para una proteína de 343 aa, mientras que el segundo *AtDjA3.2* codifica para una proteína más grande de 420 aa.

Para caracterizar las proteínas J de *Arabidopsis*, se obtuvieron líneas mutantes insercionales de T-DNA y se generaron líneas sobreexpresantes bajo un promotor constitutivo (35S) para determinar el fenotipo bajo condiciones de estrés abiótico. El fenotipo de la línea mutante para el gen *AtDjA3* fue de sensibilidad bajo condiciones de estrés salino (NaCl), osmótico (glucosa y manitol) y la aplicación de la hormona ABA, en comparación con la línea parental (Col-0) y las líneas transgénicas que sobreexpresan la versión *AtDjA3.2*, (retención del intrón) de *A. thaliana*, tanto en el porcentaje de germinación, como en el desarrollo de cotiledones verdes. Por otro parte, para la versión que procesó el intrón (*AtDjA3.1*), hasta el momento se ha logrado la obtención de las líneas sobreexpresantes de *Arabidopsis*, y posteriormente se analizará el fenotipo bajo condiciones de estrés abiótico. En lo que respecta al gen *AtDjA2*, en los resultados de germinación en glucosa y ABA se observa una diferencia en la tasa de germinación, donde se pudo observar sensibilidad en la línea mutante (*j2*) y tolerancia en las líneas transgénicas (*35S::AtDjA2*), además en las líneas transgénicas se observó desarrollo de cotiledones verdes bajo la aplicación de NaCl y glucosa.

Nuestros resultados muestran que las mutantes insercionales de los genes *AtDjA2* y *AtDjA3* presentan sensibilidad bajo condiciones de estrés abiótico (salino y osmótico), mientras que las líneas transgénicas que sobreexpresan ya sea el gen *AtDjA2* ó el *AtDjA3* son más tolerantes a las condiciones de estrés probadas, sugiriendo que podrían participar en los mecanismo que confieren tolerancia al estrés. De esta manera, es de suma importancia identificar los posibles sustratos de estas proteínas J, ya que se ha sugerido que estas proteínas J son multifuncionales y pudieran interactuar con diferentes sustratos dependiendo de las condiciones en las que se encuentre la célula.

5.1 Proteínas J: AtDjA3.1, AtDjA3.2 y AtDjA2

La secuencia parcial EST SSHPv-S38, aislada de hojas de frijol de una biblioteca sustractiva bajo condiciones de salinidad, tiene un tamaño de 790 pb, que al ser traducida *in silico* corresponden a la parte central de las proteínas J. Este segmento de la proteína de frijol (263 aa) presenta una identidad de 53.7 y 54.5% con las proteínas AtDjA2 (419 aa) y AtDjA3 (420 aa) de *A. thaliana*, respectivamente (Fig. 13).



Figura 13. Alineamiento tipo Clustal W de la secuencia SSHPv-S38 de frijol con las proteínas J de *A. thaliana*. Alineamiento de la secuencia parcial SSHPv-S38 aislada de la biblioteca sustractiva de frijol bajo condiciones de estrés, con las proteínas At5g22060 (AtDjA2) y At3g44110 (AtDjA3) de *A. thaliana*. En sombreado negro indican los aminoácidos idénticos y en gris lo que difieren en la secuencia.

El análisis de la organización genómica de los genes *AtDjA2* y *AtDjA3*, fue de la siguiente manera, el gen *AtDjA2* presenta un pre-RNA de 2,176 pb, conformado de 5 exones (I al V, cuadros negros) con un marco de lectura abierto (ORF) de 1,260 pb, 4 intrones (líneas) y las regiones 5'- y 3'-UTR (cuadros grises; Fig. 14A). En lo que respecta al gen *AtDjA3*, tiene un pre-mRNA de 2,463 pb, consta de 7 exones (I al VII, cuadros negros) que corresponden a un marco de lectura abierto

(ORF) de 1,032 pb, de 6 intrones (líneas) y las regiones 5'- y 3'-UTR (cuadros grises; Fig. 14A). De manera interesante, para el gen *AtDjA3* se ha reportado en las bases de datos dos transcritos (Genbank NM_180322: *AtDjA3.1* y NM_114279: *AtDjA3.2*). El primero de ellos, *AtDjA3.1* es el resultado de la unión de los 7 exones y el procesamiento de todos los intrones, mientras que el segundo *AtDjA3.2* es el resultado de la retención de un intrón, donde además de los exones se retiene el sexto intrón del RNA mensajero (Fig. 14B). El primer transcrito *AtDjA3.1*, codifica para una proteína de 343 aa, mientras que el segundo *AtDjA3.2* codifica para una proteína más grande de 420 aa. En la variante de splicing alternativo, el intrón retenido de 167 pb desfasa la fase del marco de lectura abierta, y continua con los 39 pb de la parte codificable del exón 7 así como 64 pb del 3'-UTR (región no codificable del exón 7). De esta manera, ésta isoforma (*AtDjA3.2*) contaría con 77 aa más en comparación a la *AtDjA3.1* (Fig. 14B).

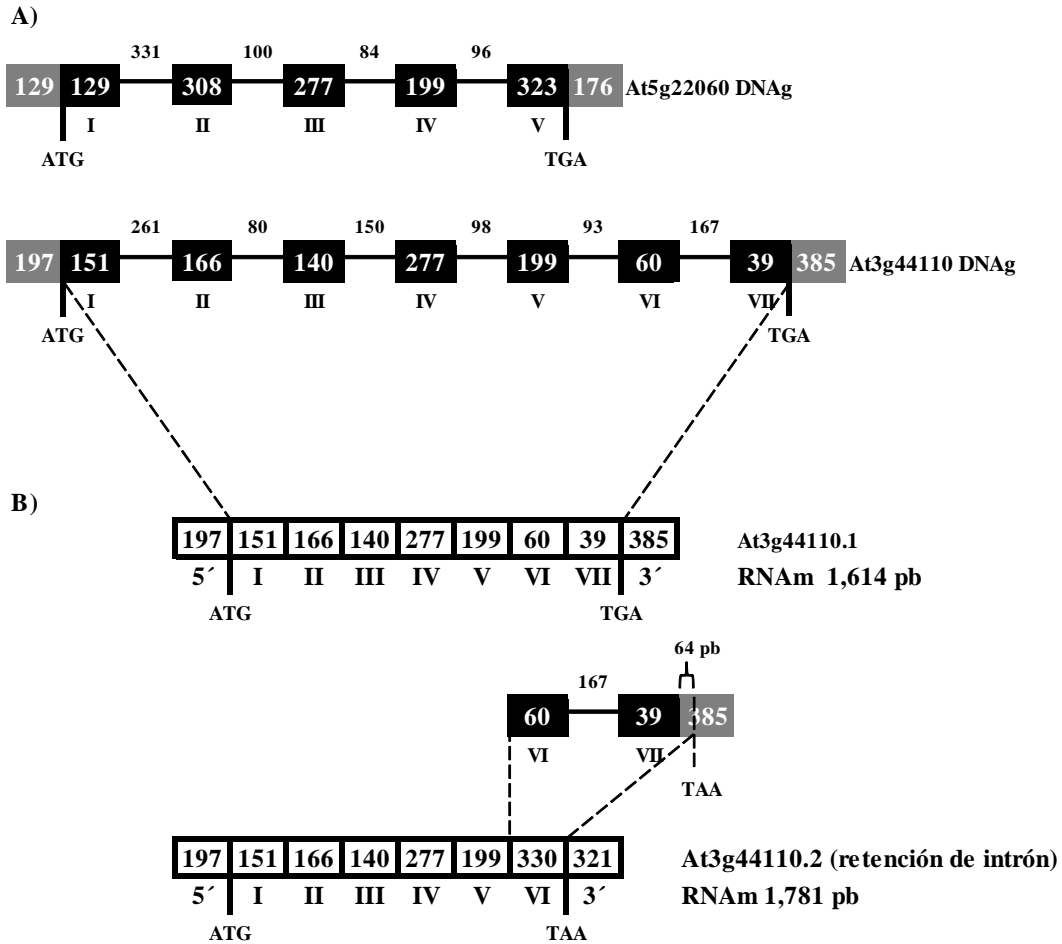


Figura 14. Esquema de la organización genómica de las proteínas J. A) Organización genómica de los genes J: At5g22060 (*AtDjA2*) y las variantes del procesamiento alternativo del gen At3g44110 (*AtDjA3*). B) Transcritos generados a partir del gen *AtDjA3*: *AtDjA3.1* y *AtDjA3.2*. Los exones (cuadros negros), los intrones (líneas) y las regiones UTRs (cuadros grises) se esquematizan y los números en los cuadros indican el tamaño de los exones.

Al comparar las proteínas J de *A. thaliana*, *AtDjA2* (419 aa) y las dos isoformas de la *AtDjA3*, se observa que la isoforma *AtDjA3.2* derivada de la retención de intrón presenta una mayor identidad con la proteína *AtDjA2* (90.8%) mientras que la isoforma *AtDjA3.1* muestra una identidad del 71.3%.

En la figura 15, se muestra un alineamiento tipo Clustal W resaltando los dominios conservados en las proteínas J de *A. thaliana* (AtDjA2, AtDjA3.1 y AtDjA3.2), los cuales presentan los dominios característicos: el dominio J (rojo) el cual contiene un tri-péptido HPD (subrayado), la región rica en glicinas y fenilalanina (verde), el dominio dedo de zinc (azul) que contienen 4 motivos ricos en cisteína (CXXCXGXG; subrayados), y por último el dominio carboxi-terminal (amarillo; Fig. 15). Estos motivos fueron identificados mediante el programa Motif Scan (http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan).

```

AtDjA3.1 MFGRGSPKKSNDTKFYEILGVPKSASPEDLKKAYKKAAIKNHPDKGGDPEKFKELAQAYE 60
AtDjA3.2 MFGRGSPKKSNDTKFYEILGVPKSASPEDLKKAYKKAAIKNHPDKGGDPEKFKELAQAYE 60
AtDjA2 MFGRGSPKKSNDTKFYEILGVPKSASPEDLKKAYKKAAIKNHPDKGGDPEKFKELAQAYE 60
*****:*****:*.*****:*****

AtDjA3.1 VLSDPKREIYDQYGEDALKEGMGGGGGHDHPFDIFSSFFGGG--PFGGNTSRQRRQRR 118
AtDjA3.2 VLSDPKREIYDQYGEDALKEGMGGGGGHDHPFDIFSSFFGGG--PFGGNTSRQRRQRR 118
AtDjA2 VLSDPKREIYDQYGEDALKEGMGGGGGHDHPFDIFSSFFGGGHPFG-SHSRGRQRR 119
*****:*****:*.***.***

AtDjA3.1 EDVVHPLKVSLEDVYLGTMKKLSLSRNALCSKCNKGSKSGASLKCQGGCQGSQGMKVSIRQ 178
AtDjA3.2 EDVVHPLKVSLEDVYLGTMKKLSLSRNALCSKCNKGSKSGASLKCQGGCQGSQGMKVSIRQ 178
AtDjA2 EDVVHPLKVSLEDVYLGTTKKLSLSRKALCSKCNKGSKSGASLKCQGGCQGSQGMKVSIRQ 179
*****:*****:*****:*****:*****

AtDjA3.1 LGPGMIQQMQHACNECKGTGETINDRDRCPOCKGDKVIPEKKVLEVNVEKGMQHSQKITF 238
AtDjA3.2 LGPGMIQQMQHACNECKGTGETINDRDRCPOCKGDKVIPEKKVLEVNVEKGMQHSQKITF 238
AtDjA2 FGPGMMQQVQHACNDCKGTGETINDRDRCPOCKGDKVISEKKVLEVNVEKGMQHNQKITF 239
:***:*.*****:*****:*****:*****

AtDjA3.1 EGQADEAPDPTVTGDIVFVLQQKEHPKFRKGEDLFVEHTLSLSTEALCGFQFVLTHLDGRS 298
AtDjA3.2 EGQADEAPDPTVTGDIVFVLQQKEHPKFRKGEDLFVEHTLSLSTEALCGFQFVLTHLDGRS 298
AtDjA2 SGQADEAPDPTVTGDIVFVIQQKEHPKFRKGEDLFVEHTISLSTEALCGFQFVLTHLDKRO 299
.*****:*****:*****:*****

AtDjA3.1 LLIKSNPGEVVKPDSYKAISDEGMPIYQRPFMK----- 331
AtDjA3.2 LLIKSNPGEVVKPDSYKAISDEGMPIYQRPFMKGLYIHFTVEFPDSLSPDQTKALEAVL 358
AtDjA2 LLIKSKPGEVVKPDSYKAISDEGMPIYQRPFMKGLYIHFTVEFPDSLSPDQTKALEAVL 359
*****:*****

AtDjA3.1 -----DEEETSSKRGL----- 343
AtDjA3.2 PKPSTAQLSDMEIDECEETTLHDVNIEDEMRRKAQAQREAYDDDDDDHPPGGAQRVQCAQQ 420
AtDjA2 PKPTKAAISDMEIDDCEETTLHDVNIEDEMRRKAQAQREAYDDDEED--HPGGAQRVQCAQQ 419
*::*

```

Figura 15. Alineamiento tipo Clustal W de las proteínas DnaJ. Alineamiento de las proteínas DnaJ de *A. thaliana* (AtDjA2, AtDjA3.1 y AtDjA3.2). Los dominios se muestran sombreados, el dominio J (rojo), la región rica en glicinas y fenilalaninas (G/F; verde), el dominio dedo de zinc (azul) y el dominio carboxi-terminal (amarillo). El tri-péptido del dominio J y los 4 motivos ricos en cisteína (CXXCXGXG) del dominio dedo de zinc se muestran subrayados.

5.1.1 Proteína AtDjA3.2, versión que retiene el intrón de *Arabidopsis thaliana*

Para la caracterización funcional del gen *AtDjA3* en respuesta a estrés abiótico, se adquirió una línea mutante insercional de T-DNA (SALK_132923) del Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto SALK. La inserción del T-DNA, está localizada dentro del cuarto exón del gen *AtDjA3* (Fig. 16A). La expresión del transcrito *AtDjA3* en la línea insercional homocigota de T-DNA, fue determinada por RT-PCR semi-cuantitativo, en donde la expresión no se detectó, confirmando que la línea de T-DNA es un alelo nulo del gen *AtDjA3* (línea mutante *j3*; Fig. 16B). Además se generaron líneas sobreexpresantes de la versión que retiene el intrón *AtDjA3.2* (420 aa), bajo el promotor constitutivo de virus del mosaico de coliflor 35S (*35S::AtDjA3.2*; Fig. 16C). El análisis de RT-PCR semi-cuantitativo de las líneas transgénicas utilizando un oligonucleótido específico del gen *AtDjA3* y otro en la región del terminador NOS, revelaron la expresión del transcrito *AtDjA3.2* en las tres líneas sobreexpresantes *35S::AtDjA3-8*, *-14* y *-15*, y se nombraron como *OvJ3-8*, *-14* y *-15* respectivamente (Fig. 16D).

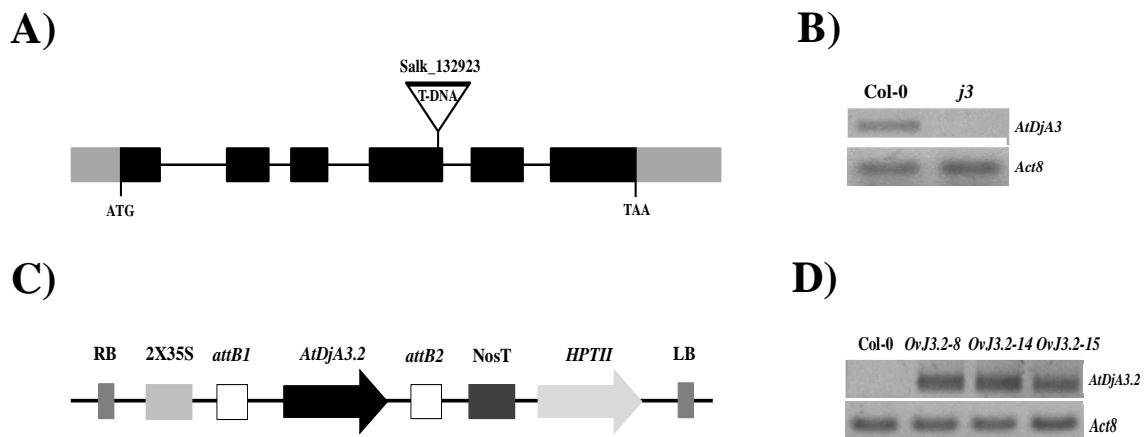


Figura 16. Líneas mutantes y sobreexpresantes del gen *AtDjA3* de *Arabidopsis thaliana*. A. Diagrama esquemático de la línea insercional de T-DNA del gen *AtDjA3*. El sitio de inserción del T-DNA (triángulo) de la línea mutante Salk_132923, localizado en el cuarto exón, UTRs (rectángulos gris), exones (rectángulos negros) e intrones (líneas). Detección del transcrito *AtDjA3* en Col-0 y la línea mutante *j3* por RT-PCR semi-cuantitativo. B Representación esquemática de la construcción de *AtDjA3.2* en el vector binario pMDC32. El borde derecho (RB) para la integración de T-DNA, promotor 2X35S del virus del mosaico de coliflor (CaMV), los sitios de recombinación *attB1* y *attB2*,

el transcrito *AtDjA3.2* (proteína J) de *A. thaliana*, la región terminadora de la nopalina sintetasa (NosT), el gen de resistencia de higromicina *HPTII* y el borde izquierdo (LB) para la integración del T-DNA. Detección del transcrito de *AtDjA3.2* en las líneas sobreexpresantes *OvJ3.2-8*, -14 y -15 de *Arabidopsis* por RT-PCR semi-cuantitativo. El total de RNA fue aislado de plántulas de 15 días de edad de *Arabidopsis*. Un microgramo del RNA total fue usado para los análisis de RT-PCR. El gen de *actina 8* (*Act8*) de *A. thaliana* fue usado como control de carga.

Además, uno de los fenotipos que se observó en las semillas de la línea mutante *j3* y en las líneas que sobreexpresan la versión *AtDjA3.2* es el tamaño de las semillas. Para esto se pesaron 500 semillas de Col-0, línea mutante *j3* y líneas sobreexpresantes *35S::AtDjA3.2* (*OvJ3.2-8*, -14 y -15). El resultado que se observó fue que la línea mutante exhibe un menor peso de 7.70 mg en comparación con 10.13 mg de Col-0, mientras que el peso de las líneas sobreexpresantes *OvJ3.2-8* y -14 fueron de 10.63 y 10.76 mg, respectivamente (Fig. 17).

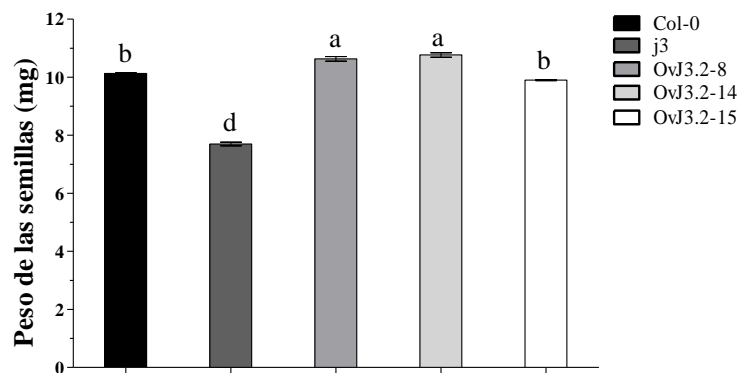


Figura 17. Gráfica del peso de las semillas de Col-0, la línea mutante *AtDjA3* y líneas sobreexpresantes *35S::AtDjA3.2-8*, -14 y -15 de *Arabidopsis thaliana*. El peso en miligramos de 500 semillas de cada una de las semillas de *Arabidopsis thaliana*. Las barras representan el promedio \pm SE (n = 500) de tres replicas. Las letras diferentes indican las diferencias significativas entre la Col-0, la línea mutante (*j3*) y las tres líneas transgénicas (*OvJ3.2-8*, -14 y -15), de acuerdo con la prueba de comparación múltiple Tukey's ($p \leq 0.05$).

5.1.1.1 El gen *AtDJA3* está involucrado en la respuesta a estrés abiótico durante la germinación

Para determinar si el gen *AtDJA3*, está involucrado en la respuesta al estrés abiótico durante la germinación, las semillas de Col-0, línea mutante (*j3*) y las líneas sobreexpresantes (*35S::AtDJA3.2-8*, -14 y -15), fueron germinadas en medio MS 0.5x suplementado con 0, 125, 150 y 175 mM de NaCl (Fig. 18). En las concentraciones de NaCl, se observó que la línea mutante (*j3*) y líneas transgénicas (*35S::AtDJA3.2*) presentaron un fenotipo de sensibilidad y de tolerancia al estrés salino, respectivamente, comparada con la Col-0. En la figura 18, las líneas sobreexpresantes *35S::OvJ3.2-8*, -14 y -15 mostraron un incremento en el porcentaje de germinación del 75, 74 y 71%, respectivamente, en comparación con el 45% de la Col-0, mientras que el porcentaje de la línea mutante *j3* fue nulo (0%) en la concentración de 175 mM de NaCl a los 6 días de germinación. En condiciones control no hubo diferencias en el porcentaje de germinación entre la línea mutante, líneas sobreexpresantes y Col-0 (Fig. 18).

NaCl

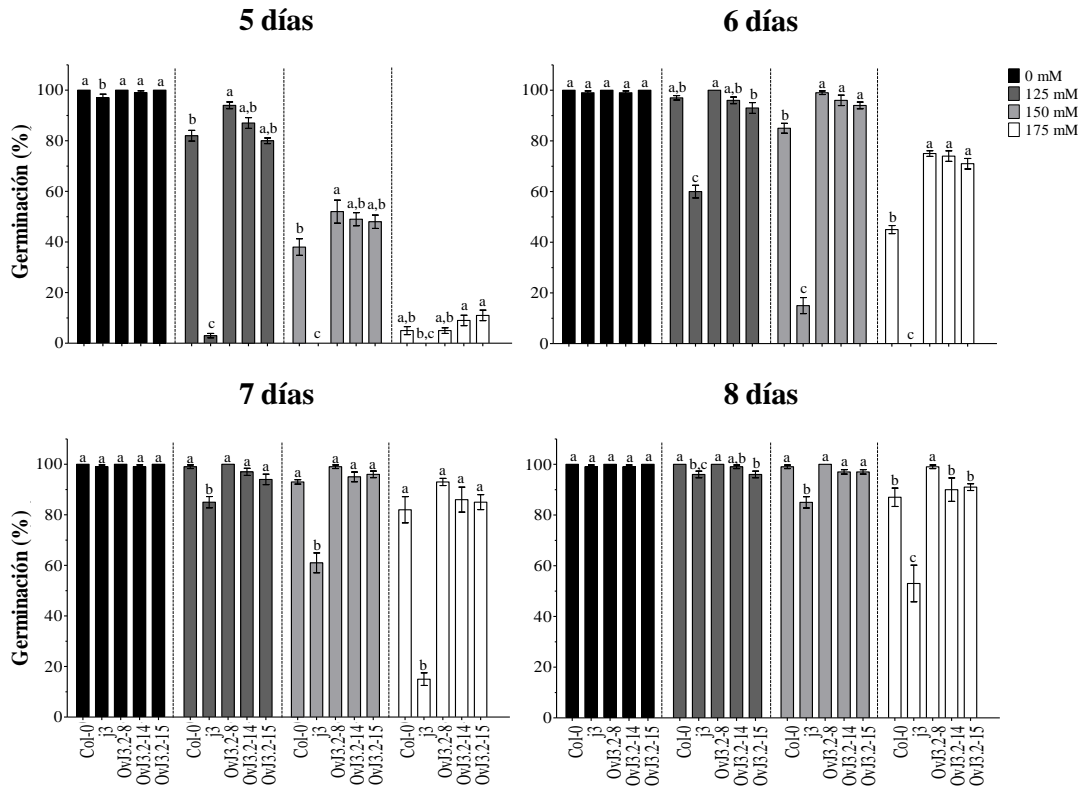


Figura 18. Porcentaje de germinación de las semillas de Col-0, línea mutante *AtDja3* y líneas sobreexpresantes *35S::AtDja3.2-8*, *-14* y *-15* de *Arabidopsis thaliana*. Las semillas fueron germinadas con 0, 125, 150 y 175 mM de NaCl y el porcentaje de germinación fue evaluado a los 5, 6, 7 y 8 días de tratamiento. Las barras representan el promedio \pm SE ($n = 20$) de cinco replicas. Las letras diferentes indican las diferencias significativas entre la Col-0, la línea mutante (*j3*) y las tres líneas transgénicas (*OvJ3.2-8*, *-14* y *-15*), de acuerdo con la prueba de comparación múltiple Tukey's ($p \leq 0.05$).

Además, de las condiciones de estrés salino, se sometieron bajo diferentes azúcares como glucosa y manitol, para inducir un estrés osmótico. Las semillas se sometieron en medio MS 0.5x conteniendo 0, 5, 6 y 7% de glucosa o manitol a los 5, 6 y 7 días de tratamiento. En la figura 19A, se muestra que a la concentración de 7% de glucosa, hubo un retraso en la tasa de germinación de la línea mutante *j3* (48%), comparada con la Col-0, mientras las líneas sobreexpresantes *35S::AtDja3.2-8*, *-14* y *-15* presentaron porcentajes de germinación más altos (81,

96, 93 y 77%, respectivamente). En el caso de las concentraciones de manitol, se observó el mismo efecto de sensibilidad en la línea mutante *j3* (Fig. 19B).

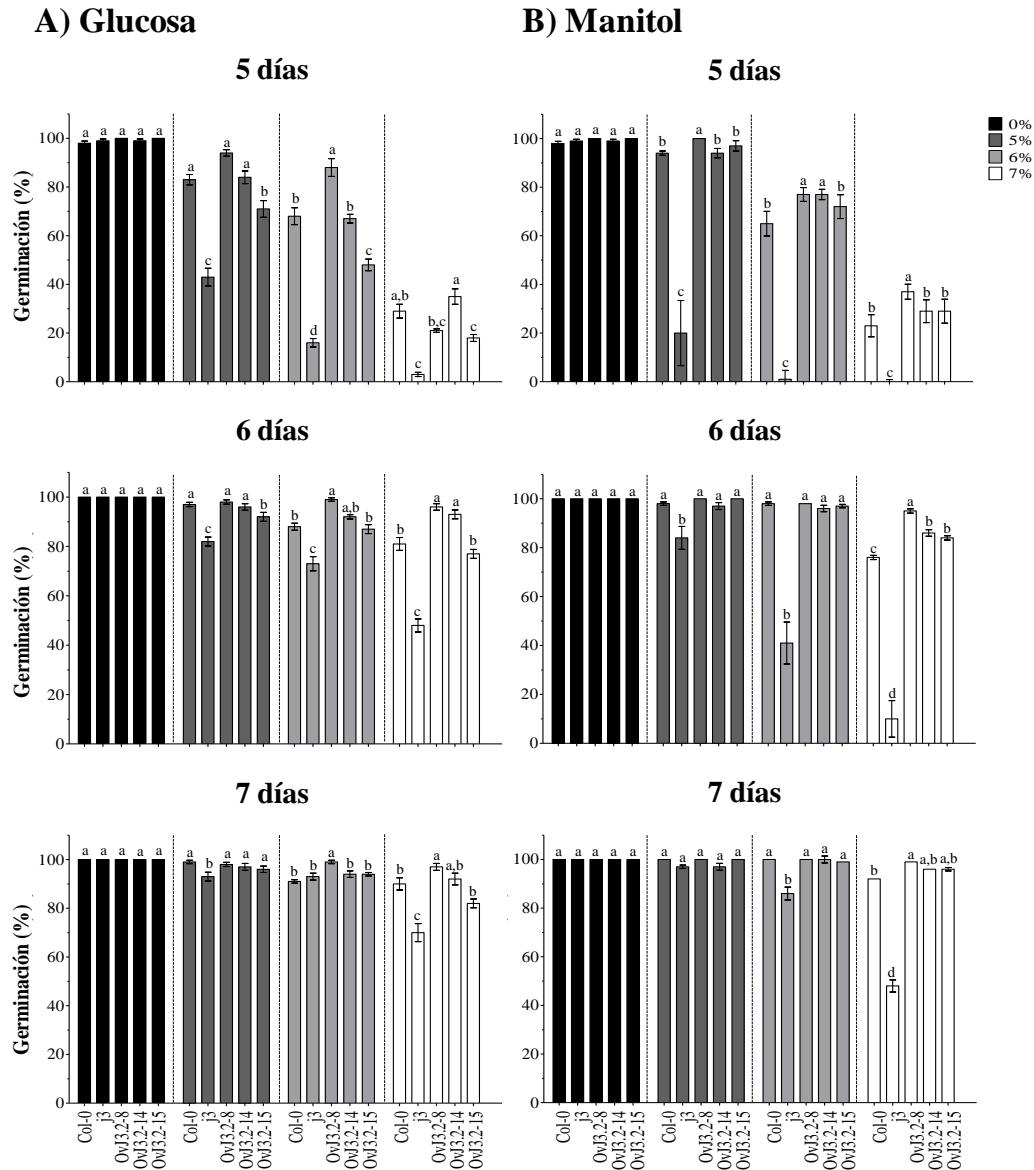


Figura 19. Porcentaje de germinación de las semillas de Col-0, línea mutante *AtDjA3* y líneas sobreexpresantes *35S::AtDjA3.2-8*, *-14* y *-15* de *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones de estrés osmótico. Las semillas fueron tratadas con 0, 5, 6 y 7% de glucosa (A) o manitol (B). Las concentraciones son equivalentes a 0, 277, 333 y 388 mM de glucosa y 0, 274, 329 y 383 mM de manitol. El porcentaje de germinación se registró a los 5, 6 y 7 días de tratamiento. Las barras representan el promedio \pm SE ($n = 20$) de cinco replicas. Las letras diferentes indican las diferencias significativas entre la Col-0, la línea mutante (*j3*) y las tres líneas transgénicas (*OvJ3.2-8*, *-14* y *-15*), de acuerdo con la prueba de comparación múltiple Tukey's ($p \leq 0.05$).

En una forma similar a lo que se describe en los experimentos de estrés salino y osmótico, la mutante nula del gen *AtDJA3* tiene un efecto negativo en la tasa de germinación bajo la aplicación de la hormona ABA (Fig. 20). En el caso de las líneas transgénicas *35S::AtDJA3.2*, no hubo diferencias significativas en la tasa de germinación comparada con la Col-0 bajo las concentraciones de 1, 3 y 5 μM de ABA a los 5, 6, 7 y 8 días (Fig. 20). En particular, las semillas de las 3 líneas transgénicas (*35S::AtDJA3.2-8*, -14 y -15) y Col-0 germinadas en presencia de 5 μM de ABA a los 8 días, se observó un porcentaje de germinación entre 80 y 90%, en comparación con el 63% de la línea mutante *j3* (Fig. 20).

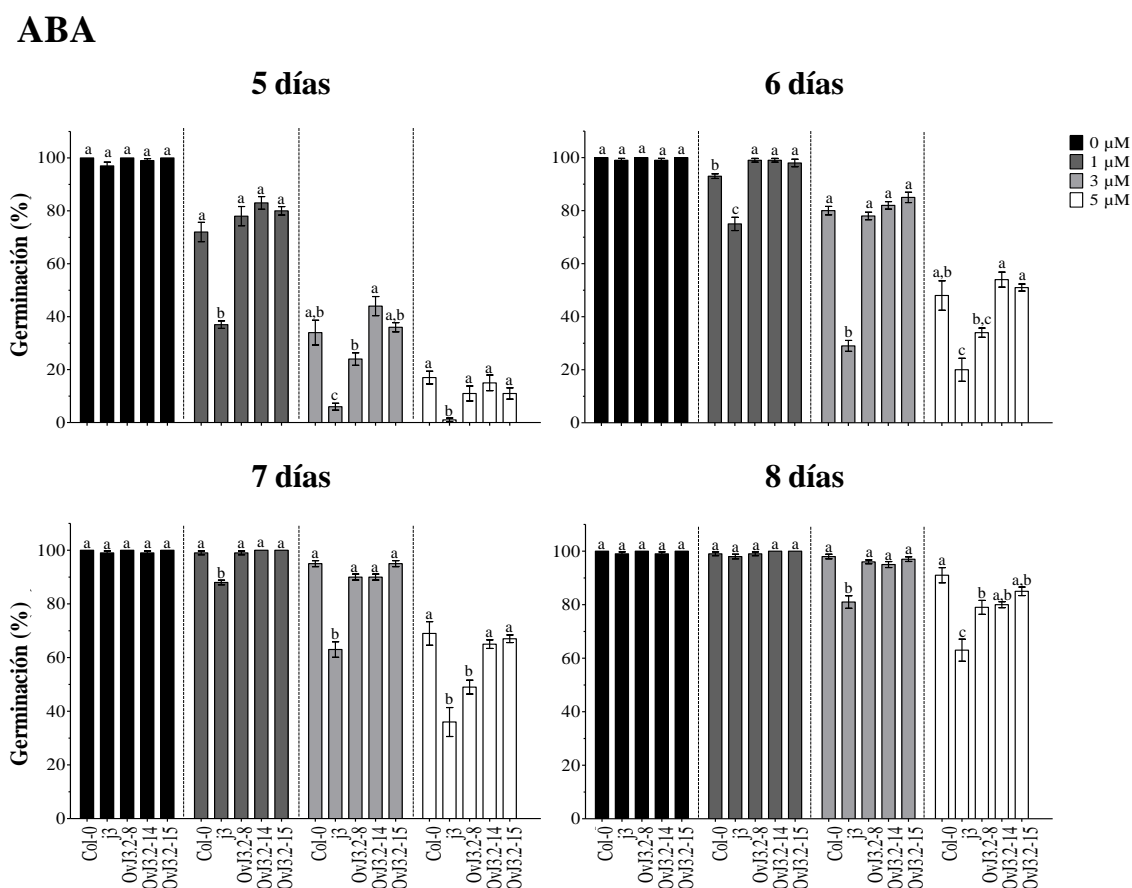


Figura 20. Efecto de la aplicación de ABA en el porcentaje de germinación de las semillas de Col-0, línea mutante *AtDJA3* y líneas sobreexpresantes *35S::AtDJA3.2-8*, -14 y -15 de *Arabidopsis thaliana*. Las concentraciones de ABA fueron de 0, 1, 3 y 5 μM y el porcentaje de germinación fue evaluado a los 5, 6, 7 y 8 días de tratamiento. Las barras representan el promedio \pm SE (n = 20) de cinco replicas. Las letras diferentes indican las diferencias significativas entre la

Col-0, la línea mutante (*j3*) y las tres líneas transgénicas (*OvJ3.2-8*, -14 y -15), de acuerdo con la prueba de comparación múltiple Tukey's ($p \leq 0.05$).

El resultado que se observó fue un retraso o aumento en la tasa de germinación con la pérdida o ganancia de función del gen *AtDjA3*, respectivamente. Por lo tanto, la proteína *AtDjA3*, podría estar involucrado en el proceso de germinación bajo estrés abiótico. Una vez que se llevó a cabo el proceso de germinación (emergencia de la radícula) de la Col-0, línea mutante (*j3*) y las líneas transgénicas (*35S::AtDjA3.2*), se prosiguió a evaluar el desarrollo de los cotiledones de cada una de las líneas bajo dichas condiciones desfavorables.

5.1.1.2 El gen *AtDjA3* favorece el desarrollo de cotiledones verdes bajo estrés abiótico

Continuando con el experimento de germinación a los 21 días, se registró el porcentaje de cotiledones verdes bajo las condiciones de NaCl, glucosa, manitol y ABA. Las plántulas de las líneas sobreexpresantes *OvJ3-8*, -14 y -15 a 150 mM de NaCl, mostraron un 95, 91 y 95% de cotiledones verdes, respectivamente, en comparación con un 90 y 42% de cotiledones verdes en Col-0 y línea mutante *j3*, respectivamente (Fig. 21A). En la figura 21B, se puede observar que la línea mutante fue la más afectada bajo las condiciones de 150 y 175 mM de NaCl. En las condiciones de estrés osmótico, específicamente a 7% de glucosa, se presentó un fenotipo marcado de sensibilidad y de tolerancia, en la línea mutante *j3* y en las líneas transgénicas *35S::AtDjA3.2*, respectivamente (Fig. 21C y D). En la figura 21C, se observó que el porcentaje de cotiledones verdes para las líneas transgénicas (*35S::AtDjA3.2*) fue de 58 a 70%, mientras que para la Col-0 y la línea mutante fue de 26 y 0%, respectivamente bajo la aplicación de glucosa 7%. Respecto a las condiciones de manitol no hubo diferencias significativas en el desarrollo de cotiledones verdes de las líneas (Col-0, *j3* y *35S::AtDjA3.2*; Fig. 21E y F). En el caso de las concentraciones de ABA (3 y 5 μM), se registró un arresto en el desarrollo de cotiledones verdes en la línea mutante *j3*, en comparación con

la Col-0 y líneas transgénicas *35S::AtDjA3.2*, donde no hubo diferencias significativas en el desarrollo de cotiledones verdes (Fig. 21G y H).

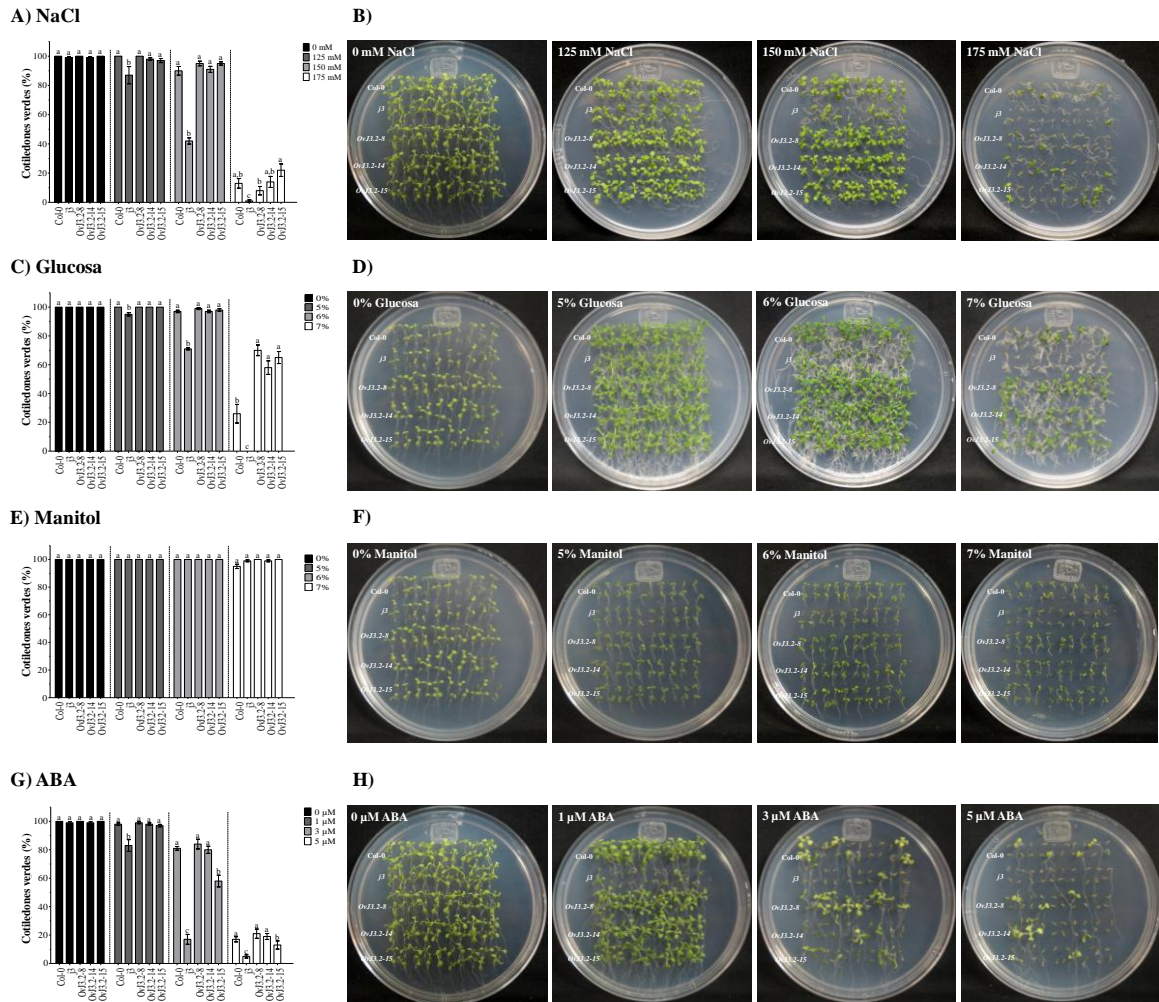


Figura 21. Cotiledones verdes de Col-0, línea mutante *AtDjA3* y líneas sobreexpresantes *35S::AtDjA3.2-8, -14 y -15* de *Arabidopsis thaliana*. El porcentaje y la morfología del desarrollo de los cotiledones verdes fueron evaluados a los 21 días de haber germinado en condiciones de NaCl, glucosa, manitol y ABA. Las condiciones fueron de 0, 125, 150 y 175 mM de NaCl (A y B), 0, 5, 6 y 7% de glucosa (C y D) o manitol (E y F) y 0, 1, 3 y 5 μM de ABA (G y H). Las barras representan el promedio ± SE (n = 20) de cinco replicas. Las letras diferentes indican las diferencias significativas entre la Col-0, la línea mutante (*j3*) y las tres líneas transgénicas (*OvJ3.2-8, -14 y -15*), de acuerdo con la prueba de comparación múltiple Tukey's ($p \leq 0.05$).

5.1.1.3 El gen *AtDjA3* está involucrado en la respuesta a estrés abiótico durante el desarrollo de plántulas

El crecimiento de las plántulas de Col-0, línea mutante *j3* y líneas sobreexpresantes *35S::AtDjA3.2*, se evaluó a los 28 días de haber germinado en presencia de estrés inducido por NaCl, glucosa y ABA (Fig. 22). El resultado que obtuvimos en los tratamientos de NaCl, glucosa y ABA, fue que las plántulas de la línea mutante mostraron un peso y tamaño reducido en comparación con las plántulas de Col-0 y líneas transgénicas (*35S::AtDjA3.2*; Fig. 22). En contraste, líneas sobreexpresantes *35S::AtDjA3.2-8*, -14 y -15, exhiben un mayor peso y tamaño únicamente en las condiciones de NaCl y ABA comparada con Col-0 (Fig. 22A, B, E y F), siendo que en las concentraciones de glucosa no hubo diferencias significativas en el peso de las plántulas de las líneas transgénicas con respecto a la parental Col-0 (Fig. 22C y D). Además, un dato interesante que se obtuvo fue que la mutante nula del gen *AtDjA3*, mostró un fenotipo de sensibilidad en medio MS 0.5x sin sacarosa, ya que las plántulas mostraron un peso y tamaño reducido, comparada con Col-0 y líneas transgénicas bajo dicha condición (Fig. 22C y D), mientras que en el medio MS 0.5x con sacarosa dichas líneas y la Col-0 no mostraron diferencias (Fig. 22A, B, E y F).

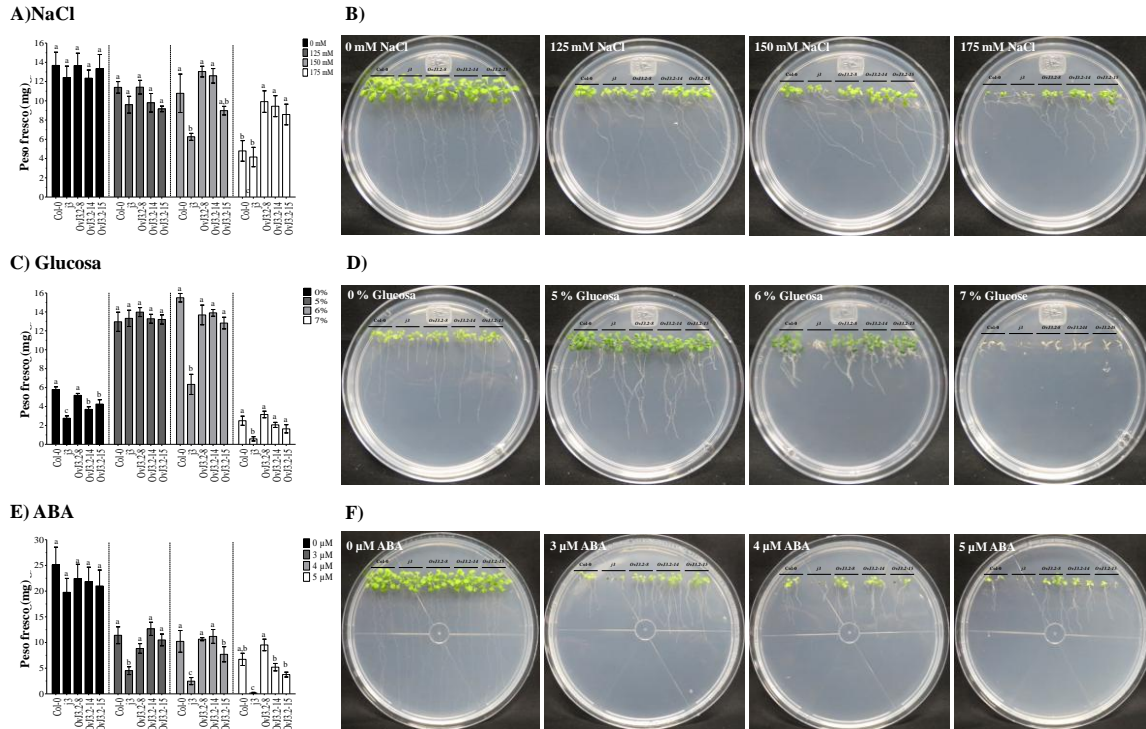


Figura 22. Crecimiento de las plántulas de Col-0, línea mutante *AtDjA3* y líneas sobreexpresantes *35S::AtDjA3.2-8, -14 y -15* de *Arabidopsis thaliana* bajo estrés abiótico. El peso fresco y la morfología de las plántulas fue evaluado a los 28 días, en condiciones de 0, 125, 150 y 175 mM NaCl (A y B), 0, 5, 6 y 7% de glucosa (C y D) y 0, 3, 4 y 5 μ M de ABA (E y F). Las barras representan el promedio \pm SE ($n = 20$) de cinco replicas. Las letras diferentes indican las diferencias significativas entre la Col-0, la línea mutante ($j3$) y las tres líneas transgénicas (*OvJ3.2-8, -14 y -15*), de acuerdo con la prueba de comparación múltiple Tukey's ($p \leq 0.05$).

5.1.2 Proteína *AtDjA3.1*, versión que procesa el intrón de *Arabidopsis thaliana*

La organización genómica del gen *AtDjA3*, consta de 7 exones y 6 intrones, el transcrito *AtDjA3.1* es el resultado del procesamiento de todos los intrones, el cual codifica para una proteína de 343 aa, esta versión presenta todos los dominios característicos de las proteínas J, con la diferencia que no presenta 77 aa de la región C-terminal comparada con las proteínas *AtDjA3.2* y *AtDjA2*, las cuales presentan una región C-terminal más grande.

Para caracterizar la proteína *AtDjA3.1* (versión que procesa todos los intrones), se generaron líneas sobreexpresantes (*35S::AtDjA3.1*) de *A. thaliana*. La estrategia para amplificar el transcrito de 1,032 pb, fue de la siguiente manera: se amplificó primero un fragmento de 1,005 pb que comprende del I al VI exón y 12 pb del VII exón, con los oligonucleótidos FwAtDjA3.1 5'-ATGTTCCGGTAGAGGACCCTCGAAGAAGAG -3' (flecha roja) y RvAtDjA3.1a 5'-ACCAGAGGCCATTCATGAAGGATGAGGAGGAA -3' (flecha verde), posteriormente para amplificar todo el transcrito se diseñó un tercer oligonucleótido RvAtDjA3.1b 5'-ATGAAGGATGAGGAGGAAGGCACAAGCTCAAAGAGAGGCTTATGA -3' (flecha azul) que comprende 6 pb del VI exón y 39 pb del VII exón con la finalidad de poder amplificar esta versión que procesa el intrón, ya que posiblemente esta versión se exprese en etapas muy específicas (Fig. 23A). Actualmente, contamos con 8 líneas transgénicas *35S::AtDjA3.1-7*, -8, -13, -15, -18, -20, -22 y -25 (generación T1; *OvJ3.1*), de las cuales se extrajo RNA para analizar la expresión del transcrito mediante RT-PCR. El gen *Apt1* (At1g27450) de *Arabidopsis* fue usado como control de carga. En la figura 23B, se muestra los niveles de expresión de las líneas transgénicas comparada con la Col-0. Las líneas sobreexpresantes *35S::AtDjA3.1-13*, -15 y -18, fueron seleccionadas para llevar a cabo el análisis de fenotipo bajo condiciones de estrés abiótico (Fig. 23B).

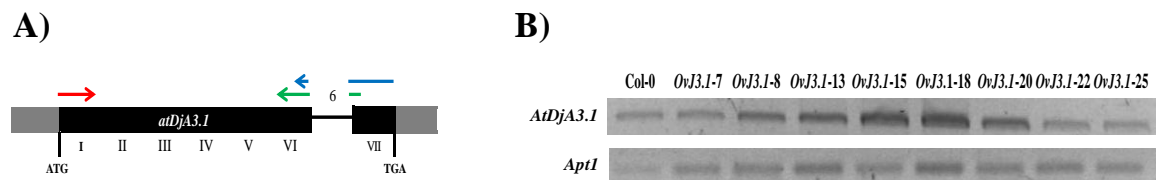


Figura 23. Esquema del diseño de los oligonucleótidos y la expresión del transcrito *AtDjA3.1* en las líneas sobreexpresantes *35S::AtDjA3.1* de *Arabidopsis thaliana*. A) Los oligonucleótidos diseñados para amplificar el transcrito *AtDjA3.1* de 1,032 pb para generar líneas sobreexpresantes. Los oligonucleótidos (flecha roja, verde y azul), exones (cuadros negros), intrón (línea) y las regiones UTRs (cuadros grises) se esquematizan. B) Detección del transcrito *AtDjA3.1* en las líneas sobreexpresante *35S::AtDjA3.1-7*, -8, -13, -15, -18, -20, -22 y -25 (*OvJ3.1-7*, -8, -13, -15, -18, -20, -22 y -25, respectivamente) por RT-PCR semi-cuantitativo. El RNA total fue aislado de

plántulas de 15 días de edad. Un microgramo del RNA total fue usado para el análisis de RT-PCR. El gen adenina fosforribosil transferasa 1 (*Apt1*) de *A. thaliana* fue usado como control de carga.

5.1.3 Proteína *AtDjA2* de *Arabidopsis thaliana*

Para la caracterización funcional del gen *AtDjA2* en respuesta a estrés abiótico, se adquirió una línea mutante insercional de T-DNA (Salk_071563) del Laboratorio de Análisis Genómico del Instituto SALK. La inserción del T-DNA, está localizada en el primer intrón del gen *AtDjA2* (Fig. 24A). La expresión del transcrito *AtDjA2* en la línea insercional homocigota de T-DNA, fue determinada por RT-PCR semi-cuantitativo, en donde la expresión no se detectó, confirmando que la línea de T-DNA es un alelo nulo (línea mutante *j2*) del gen *AtDjA2* (Fig. 24B). Además, se generaron líneas sobreexpresantes del gen *AtDjA2* en plantas de *A. thaliana*, bajo el promotor constitutivo de virus del mosaico de coliflor 35S (*35S::AtDjA2*; Fig. 24C). El análisis de RT-PCR semi-cuantitativo de las líneas transgénicas utilizando un oligonucleótido específico del gen *AtDjA2* y otro en la región del terminador NOS, revelaron la expresión del transcrito *AtDjA2* en tres líneas sobreexpresantes *35S::AtDjA2*-3, -5 y -7, y se nombraron como *OvJ2*-3, -5 y -7 respectivamente (Fig. 24D).

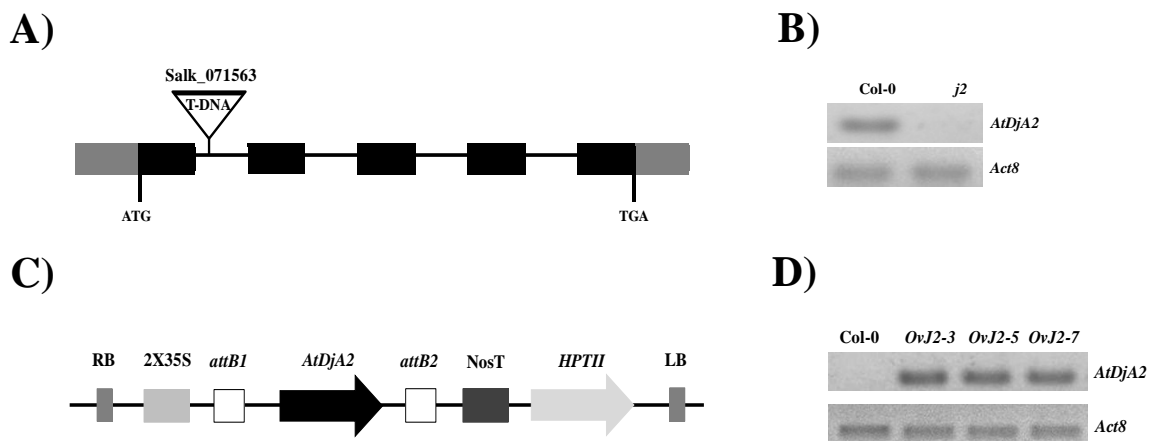


Figura 24. Línea mutante y líneas sobreexpresantes del gen *AtDjA2* de *Arabidopsis thaliana*.

A) Diagrama esquemático de la línea insercional de T-DNA del gen *AtDjA2*. El sitio de inserción del T-DNA (triángulo) de la línea mutante Salk_071563, localizado en el cuarto exón, UTRs (rectángulos gris), exones (rectángulos negros) e intrones (líneas). B) Detección del transcrito

AtDjA2 en Col-0 (WT) y la línea mutante *j2* por RT-PCR semi-cuantitativo. C) Representación esquemática de la construcción de *AtDjA2* en el vector binario pMDC32. El borde derecho (RB) para la integración de T-DNA, promotor 2X35S del virus del mosaico de coliflor (CaMV), los sitios de recombinación *attB1* y *attB2*, el transcrito *AtDjA2* (proteína J) de *A. thaliana*, la región terminadora de la nopalina sintetasa (NosT), el gen de resistencia de higromicina *HPTII* y el borde izquierdo (LB) para la integración del T-DNA. D) Detección del transcrito de *AtDjA2* en las líneas sobreexpresantes *OvJ2-3*, -5 y -7 de *Arabidopsis* por RT-PCR semi-cuantitativo. El total de RNA fue aislado de plántulas de 15 días de edad de *Arabidopsis*. Un microgramo del RNA total fue usado para los análisis de RT-PCR. El gen de *actina 8* (*Act8*) de *A. thaliana* fue usado como control de carga.

5.1.3.1 El gen *AtDjA2* desempeña un papel importante en la tolerancia al estrés abiótico durante la germinación

Para determinar si el gen *AtDJA2* está involucrado en la respuesta al estrés durante el proceso de germinación, se realizaron experimentos de germinación bajo condiciones de estrés salino, osmótico y la aplicación de la hormona ABA. De esta manera, las semillas Col-0, línea mutante (*j2*) y las líneas sobreexpresantes (*OvJ2-3*, -5 y -7), fueron germinadas en medio MS 0.5X conteniendo diferentes concentraciones de NaCl, glucosa, manitol y ABA a los 5, 6 y 7 días. En el caso de las concentraciones de glucosa (4, 5 y 6%) se muestra un efecto marcado de sensibilidad o tolerancia en la supresión o sobreexpresión del gen *AtDJA2*, respectivamente (Fig. 25A). Asimismo, en la concentraciones de ABA (4, 5 y 6 μ M), las líneas sobreexpresantes *OvJ2-3* y -5 se pudo observar un aumento en la tasa de germinación a los 5 y 6 días, comparada con la Col-0, la línea mutante *j2* y la línea sobreexpresante *OvJ2-7* (Fig. 25B). Sin embargo, para las condiciones de NaCl y manitol, no hubo diferencias en la tasa de germinación entre la Col-0, la línea mutante (*j2*) y las líneas transgénicas (*35S::AtDjA2*; datos no mostrados).

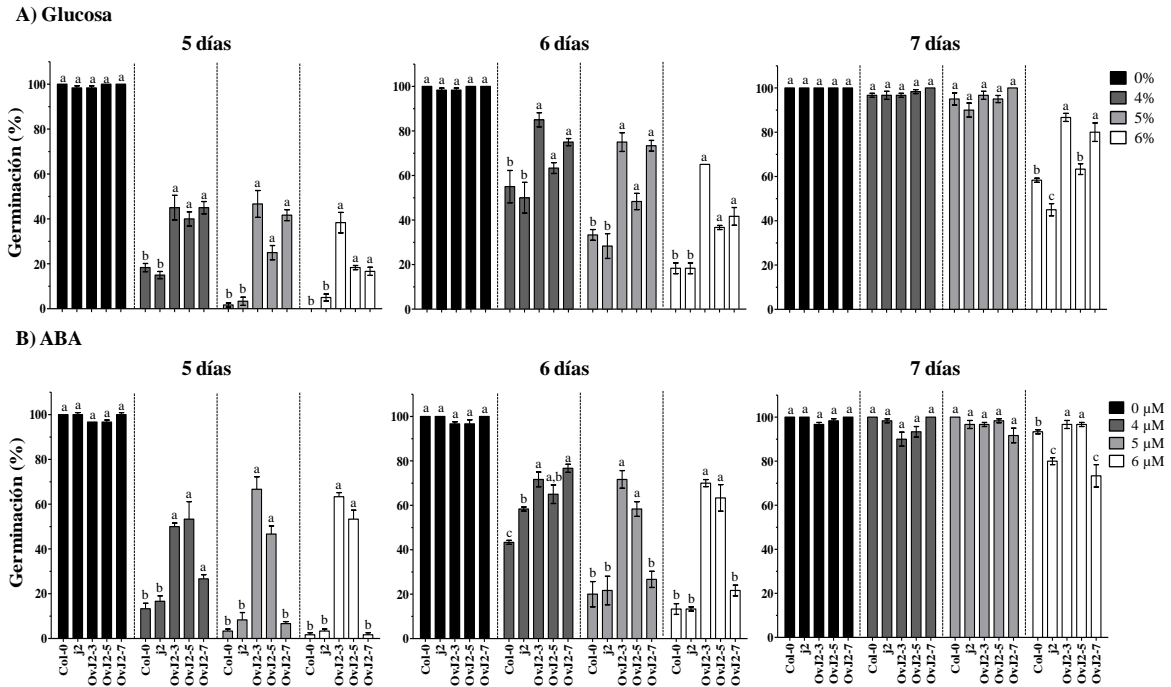


Figura 25. Porcentaje de germinación de las semillas de Col-0, línea mutante *AtDjA2* y líneas sobreexpresantes *35S::AtDjA2-3, -5 y -7* de *Arabidopsis thaliana*. Las semillas fueron germinadas con 0, 4, 5 y 6% de glucosa (A) y 0, 4, 5 y 6 μM de ABA (B). El porcentaje de germinación fue evaluado a los 5, 6 y 7 días de tratamiento. Las barras representan el promedio ± SE (n = 20) de tres replicas. Las letras diferentes indican las diferencias significativas entre el WT (Col-0), la línea mutante (*j2*) y las tres líneas transgénicas (*OvJ2-3, -5 y -7*), de acuerdo con la prueba de comparación múltiple Tukey's (p ≤ 0.05).

Después del proceso de germinación (emergencia de la radícula) de la Col-0, línea mutante (*j2*) y las líneas transgénicas (*35S::AtDjA2*), se prosiguió a evaluar el desarrollo de los cotiledones de cada una de las líneas bajo condiciones de estrés.

5.1.3.2 La sobreexpresión del gen *AtDjA2* aumenta el porcentaje de cotiledones verdes bajo estrés abiótico

A partir del experimento de germinación a los 21 días, el porcentaje de cotiledones verdes fueron registrados bajo las condiciones de estrés salino y osmótico (glucosa y manitol). En las condiciones de estrés osmótico, específicamente en 5% de glucosa, se observó que en la línea mutante *j2* y la Col-0 tuvieron solo el 20

y 35% respectivamente, de plántulas con cotiledones verdes, mientras que para las líneas sobreexpresantes *OvJ2-3*, *-5* y *-7* fue del 63, 45 y 66% respectivamente (Fig. 26A). En las fotografías a las concentraciones de 5% de glucosa, se pudo observar que la línea mutante *j2* fue la más afectada en el desarrollo de cotiledones (Fig. 26A). Mientras que en la condiciones de manitol no hubo diferencias significativas en el desarrollo de cotiledones verdes de las líneas (*Col-0*, *j2* y *35S::AtDjA2*; datos no mostrados). Las plántulas de las líneas sobreexpresantes *OvJ2-3*, *-5* y *-7*, a 125 mM de NaCl, mostraron un 58, 43 y 70% de cotiledones verdes, respectivamente, en comparación con 40 y 26% de cotiledones verdes en la *Col-0* y línea mutante *j2*, respectivamente (Fig. 26B).

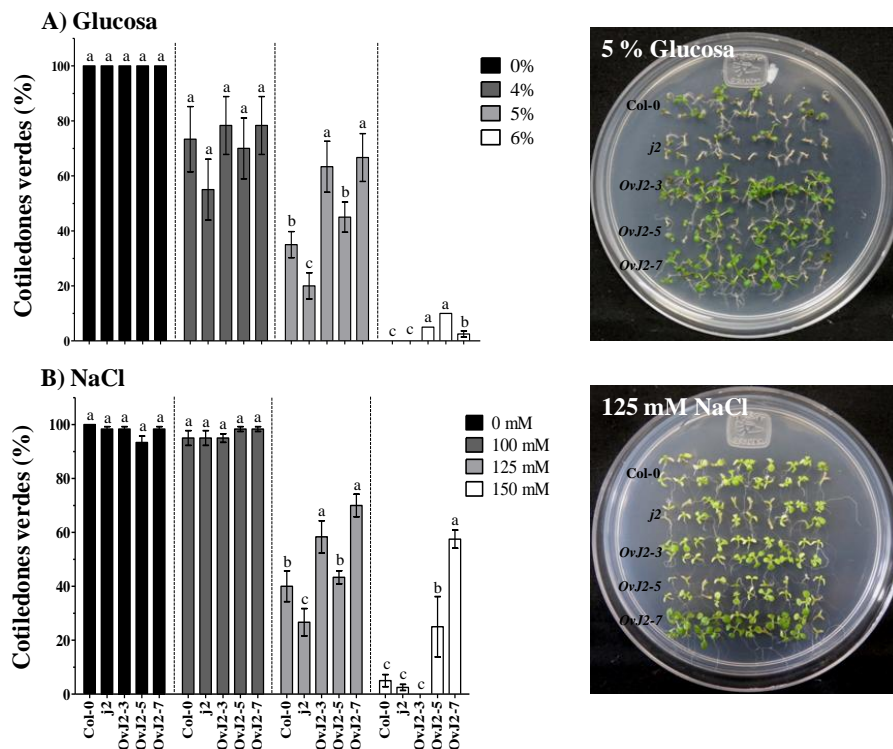


Figura 26. Cotiledones verdes de *Col-0*, línea mutante *AtDjA2* y líneas sobreexpresantes *35S::AtDjA2-3*, *-5* y *-7* de *Arabidopsis thaliana*. El porcentaje y la morfología de los cotiledones verdes fueron evaluados a los 21 días de haber germinado bajo diferentes concentraciones de glucosa y NaCl. Las concentraciones fueron de 0, 4, 5 y 6% de glucosa (A), 0, 100, 125 y 125 mM de NaCl (B). Las barras representan el promedio \pm SE ($n = 20$) de tres replicas. Las letras diferentes indican las diferencias significativas entre el WT (*Col-0*), la línea mutante (*j2*) y las tres líneas transgénicas (*OvJ2-3*, *-5* y *-7*), de acuerdo con la prueba de comparación múltiple Tukey's ($p \leq 0.05$).

5.1.3.3 Identificación de los posibles interactores de la proteína AtDjA2 mediante el sistema de doble híbrido “Split-ubiquitin”

Se ha reportado que las proteínas J son multifuncionales, posiblemente estas proteínas podrían tener más de una proteína blanco, por lo tanto es importante identificar cuáles son las proteínas blanco de las proteínas J. El fundamento del sistema de dos híbridos “Split-ubiquitin”, se explicó en el apartado 4.2.

Actualmente, se están llevando a cabo los ensayos de controles para verificar que la construcción “bait” (*pDHB1-AtDjA2*), se expresa correctamente en la levadura NMY51 y que por consiguiente pudiera interactuar con otras proteínas que se encuentran en el vector “prey” (biblioteca de cDNA de *Arabidopsis*).

VI. Discusión

Las plantas por ser organismos sésiles están continuamente expuestas a condiciones ambientales adversas, las cuales limitan su crecimiento y desarrollo. Sin embargo, en la actualidad dichas condiciones se están acentuando debido a la contaminación ambiental y al cambio climático que se está presentando en el planeta. De esta manera, las plantas han desarrollado mecanismos de adaptación para contrarrestar todos estos agobios, tanto a corto como a largo plazo. Además, las plantas varían en su tolerancia al estrés, debido a que presentan ciertos cambios anatómicos, fisiológicos y moleculares, que les permiten sobrevivir a dichas situaciones.

El estrés por sequía, salinidad y temperaturas extremas, están a menudo interconectados, y pueden inducir un daño celular; por ejemplo la sequía y salinidad se manifiestan principalmente como estrés osmótico, lo que resulta en la interrupción de la homeostasis y la distribución de los iones en la célula (Zhu, 2001). El estrés oxidativo que con frecuencia acompaña al estrés por sequía, temperaturas extremas y salinidad, causan la desnaturalización de proteínas funcionales y estructurales (Smirnov, 1998). Uno de los fenómenos más comunes cuando la planta se ve afectada bajo condiciones de estrés es la pérdida de la estructura e inactivación de las proteínas. Por lo tanto, la planta cuenta con un sistema complejo de chaperonas moleculares como las proteínas de choque térmico (HSP). Dichas HSP se han clasificado de acuerdo a su peso molecular, y son esenciales para los procesos celulares, como la síntesis, el plegamiento, el replegamiento, la localización subcelular, y el transporte de proteínas, y la prevención de agregados de proteínas (Mayer y Bukau, 2005). La expresión de las HSP se ha descrito principalmente bajo condiciones de estrés por calor, sin embargo, también se inducen bajo otras condiciones de estrés, como frío, sequía y salinidad, entre otros (Noven y col., 1992; Kilstrup y col., 1997).

Nuestro grupo de investigación, se ha enfocado en la identificación de genes de respuesta a estrés abiótico, mediante la construcción de bibliotecas de cDNA de plantas que son capaces de tolerar diversas condiciones ambientales debido a que presentan ciertas características que les confieren tolerancia al estrés abiótico, tales como la variedad Pinto Villa de frijol (*Phaseolus vulgaris*), tolerante a sequía y salinidad, y *Opuntia streptacantha* (nopal), la cual es una planta que crece en regiones áridas y semiáridas. De esta manera, a partir de la biblioteca sustractiva (SSH) de frijol, se identificó un EST que mostró homología con las proteínas J de plantas (Hernández-Lucero y col., 2013), y en el caso de la biblioteca de cDNA de nopal, identificamos un EST que mostró homología con las sHSP de plantas (Ochoa-Alfaro y col., 2012). El frijol y el nopal constituyen plantas de interés agronómico en nuestro país; sin embargo, las herramientas de biología molecular aún no han sido eficientemente desarrolladas para estas plantas. Por ello, se propuso la caracterización de genes ortólogos a las proteínas J de frijol en *Arabidopsis thaliana*, así como la caracterización funcional del gen sHSP de nopal en ésta planta modelo.

De la biblioteca de cDNA de nopal, se obtuvieron 329 unigenes, de los cuales el 9% representan aquellos genes que codifican proteínas que están relacionadas en respuesta al estrés y dentro de este grupo elegimos estudiar para caracterizar molecular y funcionalmente el unigen que codifica para una proteína de choque térmico de bajo peso molecular OpsHSP18. La función de las proteínas sHSP es prevenir la agregación de proteínas y/o estabilizar proteínas desplegadas durante condiciones de estrés (Scharf y col., 2012; Waters, 2013).

La proteína OpsHSP18 de nopal presenta rasgos característicos de la familia de las sHSP de plantas, tales como el dominio α -cristalino, involucrado en la unión al sustrato y en la interacción entre las subunidades de los complejos oligomericos formados por las sHSP (Kim y col., 1998), la región N-terminal, la cual se ha propuesto que es la región de unión y especificidad al sustrato desplegado y la región C-terminal, que se ha sugerido que estabiliza la estructura oligomérica

(Vierling y col., 2009). Además, con base en el estudio filogenético realizado de la proteína OpsHSP18 con respecto a las 19 proteínas sHSP que se han identificado en *Arabidopsis thaliana*, la proteína OpsHSP18 mostró estar relacionada con las proteínas AtHSP17.4 (At3g46230), AtHSP17.6C (At1g53540) y AtHSP18.1 (At5g59720), las cuales pertenecen a la clase citoplasmática (CI), particularmente la conservación se encontró en el dominio α -cristalino y la región C-terminal, mientras que la región N-terminal de las sHSP fue la más variable.

Los genes que codifican para las proteínas sHSP se inducen bajo condiciones de estrés por calor, sequía, salinidad, oxidativo, osmótico, metales pesados, entre otros (Siddique y col., 2008); sin embargo, en condiciones sin estrés, las síntesis de sHSP en plantas puede ser en etapas de desarrollo, tales como la embriogénesis, la germinación, el desarrollo del polen y la maduración de frutos (Sun y col., 2002; Morrow y Tanguay, 2012). En embriones de *Arabidopsis*, las proteínas AtHsp17.4-CI y AtHsp17.6-CI, y AtHsp17.7-CII, comienzan a acumularse en la etapa de maduración de la semilla y en semilla seca (Sun y col., 2001; Wehmeyer y col., 1996). La síntesis de sHSP junto con la maduración de la semilla sugiere que las sHSP podrían ser importantes para la protección de los componentes celulares contra la desecación (Wehmeyer y col., 1996). Los genes *OsHsp24.15* y *OsHsp18.03* de *Oryza sativa*, mostraron una expresión elevada en el endosperma, indicando que los genes HSP podrían jugar un papel en el desarrollo de la semilla de arroz (ShuiFeng y col., 2012).

De esta manera, se llevó a cabo la caracterización funcional del gen *OpsHSP18* de nopal en *A. thaliana*, con la finalidad de estudiar el posible papel que tiene al sobreexpresar dicho gen en experimentos de germinación y de supervivencia bajo condiciones de estrés. La sobreexpresión del gen *OpsHSp18* exhibe un alto porcentaje de germinación en condiciones de estrés salino y osmótico, además las líneas transgénicas (*35S::OpsHSP18*) presentaron un mayor desarrollo de cotiledones verdes comparado con la línea parental Col-0 (WT). Por lo tanto,

nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión del gen *OpsHSP18* podría influir en el vigor de la semilla en condiciones de estrés abiótico.

Por otro lado, la sobreexpresión del gen *OpsHSP18*, mostro tener un efecto positivo en la tasa de germinación bajo la aplicación de la fitohormona ABA. Se ha reportado que el gen *ABI3*, el cual codifica para un factor de transcripción, regula varios genes específicos de la semilla (Parcy y col., 1995), esto sugiere que *ABI3* está involucrado en la activación transcripcional de los factores de transcripción de choque térmico (HSF) y estos a su vez son activadores de transcripción de los genes sHSP (Rojas y col., 1999; Kotak y col., 2007). Se ha reportado la expresión de las sHSP de plantas en la respuesta a tratamientos de ABA (Zou y col., 2009). Aunque, los mecanismos entre la ruta de señalización del ABA y las sHSP no se entienden completamente, nuestros datos podrían ser claves para su comprensión.

De esta manera, se ha reportado que el incremento de la expresión de las proteínas sHSP correlaciona con la tolerancia al estrés. El estrés por calor, salino, metales pesados, entre otros provoca daños en la integridad de la membrana, lo cual provoca un incremento en los electrolitos, y se ha utilizado como marcador del daño celular (Temsamani y col., 1995; Sugimoto y col., 2003). En plantas transgénicas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), que sobreexpresan el gen *MshSP23* mitocondrial de alfalfa, mantienen la integridad de las membranas bajo condiciones de estrés salino, posiblemente al aumentar la captación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria, logrando plantas más tolerantes al estrés (Ki-Won y col., 2012). La sobreexpresión del gen *OpsHSP18* de nopal en *Arabidopsis* confiere tolerancia a estrés salino y osmótico (manitol), donde se observó un incrementó en la tasa de supervivencia de las líneas sobreexpresantes (*35S::OpsHSP18*) en *Arabidopsis* después del periodo de estrés. Lo anterior nos sugiere que el gen *OpsHSP18* de *Opuntia streptacantha*, podría jugar un papel importante en el proceso de geminación, establecimiento de plántulas y en la supervivencia de plántulas bajo condiciones de estrés abiótico.

En lo que respecta a la biblioteca sustractiva (SSH) de frijol, se seleccionó el EST SSHPv-S38 de un tamaño de 790 pb, esta secuencia parcial al ser traducida *in silico* codifica para 263 aminoácidos, que corresponde a la parte central de las proteínas J, por lo tanto el objetivo que se planteó fue caracterizar los genes ortólogos *AtDjA2* y *AtDjA3* de *A. thaliana*. Dicha proteína parcial de frijol (263 aa) presenta una identidad de 53.7 y 54.5% con las proteínas *AtDjA2* y *AtDjA3* de *Arabidopsis*, respectivamente. Estas proteínas pertenecen al tipo I ó A de la familia de las proteínas J, las cuales presentan todos los dominios característicos como: el dominio J, la región rica en glicinas y fenilalaninas (G/F), el dominio dedo de zinc y la región C-terminal.

En el caso del gen *AtDjA3* genera dos transcritos, la versión *AtDJA3.1* es el resultado del procesamiento de todos sus intrones, codificando una proteína de 343 aa, mientras que la versión *AtDjA3.2* es el resultado de la retención de un intrón, codificando una proteína más grande de 420 aa. El porcentaje de identidad de los genes parálogos *AtDjA2* y *AtDjA3.2* (versión que retiene el intrón) es de 90.8% a nivel de proteína, y la versión que procesa todos sus intrones *AtDjA3.1*, presenta el 77.4 y 71.3% con las proteínas *AtDjA3.2* y *AtDjA2*, respectivamente. La región C-terminal de las proteínas J, presenta una secuencia CAQQ que sirve como un sitio de reconocimiento de isoprenilación, cuya función es facilitar la asociación a las membranas celulares en condiciones de estrés (Zhu y col., 1993a; Zhu y col., 1993b). La versión *AtDjA3.1* al tener una región C-terminal más corta (77 aa menos), no cuenta con dicha secuencia CAQQ, por lo que no tendría la capacidad de unirse y proteger a las proteínas de membrana durante condiciones de estrés. Sin embargo, esta versión corta podría tener cambios en su estructura y así verse reflejado en sus interacciones proteína-sustrato, y además que su expresión sea tiempo y tejido específico. De esta manera, sería importante elucidar las posibles funciones de las dos versiones.

Por otro lado, se ha reportado que variantes de splicing alternativo de las proteínas J son expresión tejido específico. Por ejemplo, en humano se ha

descrito una variante de procesamiento de la DnaJA1, la cual es homóloga a las proteínas AtDjA2 y AtDjA3 de *Arabidopsis* (Hu y col., 2004). La versión *DnaJA1* codifica una proteína de 397 aa, en cambio la versión que presenta el splicing alternativo *nDnaJA1* es de 331 aa, debido a que el último intrón es retenido, y solo se traducen cinco aa del intrón (Hu y col., 2004). Esta versión de humano es interesante (*nDnaJA1*) debido a que coincide con la versión *AtDjA3.1* de *Arabidopsis*, ya que ambas presentan una región C-terminal más corta; siendo más específicos, la versión de *Arabidopsis* carece de 77 aa y la del humano de 66 aa del final de la proteína en comparación a sus isoformas respectivas. Por otra parte, la versión que la *DnaJA1* de humano es altamente expresada en testículos y pulmón, pero su expresión es baja en colon e hígado, mientras que la isoforma *nDnaJA1* (versión pequeña) es altamente expresada en colon e hígado (Hu y col., 2004). Por consiguiente, sería importante determinar si las isoformas de *Arabidopsis* se expresan de manera tejido específico y/o en diversas condiciones de estrés.

Para la caracterización molecular de las proteínas J, se obtuvieron líneas insercionales de T-DNA, Salk_132923 y Salk_071563 de los genes *AtDjA3* y *AtDj2*, respectivamente, asimismo se generaron líneas sobreexpresantes bajo el promotor constitutivo 35S, con la finalidad de determinar el fenotipo bajo condiciones de estrés abiótico. Se observó que en las líneas mutantes de los genes *AtDJA2* y *AtDjA3*, presentaron un fenotipo de retraso en la tasa de germinación y un arresto en el desarrollo de cotiledones verdes bajo condiciones de estrés salino, osmótico (glucosa y manitol) y al aplicar la hormona ABA, caso contrario al fenotipo observado en las líneas transgénicas (*35S::AtDjA2* y *35S::AtDjA3*) donde se mostró un aumento en la tasa de germinación y de desarrollo de cotiledones verdes. Cabe mencionar que el efecto que se observó bajo las condiciones de estrés utilizadas, fue en la velocidad de germinación de las semillas.

En un reporte previo Li y col. (2007), estudiaron los genes *AtDJA2* y *AtDJA3* bajo condiciones de estrés por calor, reportando que solo la doble mutante (*Atdja2/Atdja3*), mostró un fenotipo de sensibilidad a elevadas temperaturas en comparación a las líneas mutantes sencillas (*Atdja2* y *Atdja3*) y a la Col-0. El experimento consistió en someter plántulas de 10 días de edad de las líneas mutantes sencillas (*Atdja2* y *Atdja3*), la doble mutante (*Atdja2/Atdja3*) y la Col-0 a 45 °C durante 100 minutos (min), y después del choque térmico se colocaron a 22 °C por 7 días para observar su fenotipo en recuperación. En particular, el fenotipo de las mutantes sencillas no mostraron diferencias importantes en comparación con la Col-0, sin embargo en la doble mutante se observó un fenotipo de clorosis a los 7 días de recuperación (Li y col., 2007). Cabe señalar que en el trabajo de Li y col., coincidimos con la misma línea insercional de T-DNA (Salk_071563) para el gen *AtDjA2*, pero para el gen *AtDjA3*, nosotros trabajamos con la línea Salk_132923, que se localiza río arriba de la línea Salk_141625 con la cual ellos trabajaron. Ambas líneas presentan la inserción de T-DNA en la región del ORF, por lo que las dos líneas interrumpen dicho gen. El resultado de Li y col., muestra que las líneas sobreexpresantes, mostraron termotolerancia a 45 °C durante 120 min, comparando con la Col-0.

Por lo tanto, Li y col. (2007) sugiere que estas proteínas J, *AtDjA2* y *AtDjA3*, son redundantes bajo condiciones de estrés por calor, ya que las líneas mutantes insercionales sencillas, no presentan fenotipo sensible a esas condiciones de estrés por calor, sugiriendo que el gen parálogo compensa la función del otro, sin embargo nuestros resultados podrían sugerir que las proteínas *AtDjA2* y *AtDjA3*, no son redundantes al menos en condiciones de estrés salino, osmótico y la aplicación de ABA, ya que cada una de las líneas mutantes presenta un fenotipo característico de sensibilidad bajo condiciones de estrés.

En el reporte de Zhu y col. (1993a), describen la proteína J (ANJ1) de *Atriplex nummularia* (una especie arbustiva forrajera de alta adaptabilidad a la aridez y semiaridez), la cual es homóloga a la DnaJ de *Saccharomyces cerevisiae*.

Demostraron que la proteína ANJ1, presenta una homología funcional a YDJ1/IMAS5, porque fue capaz de complementar el fenotipo de crecimiento de sensibilidad a temperatura de la mutación de $\Delta ydj1/mas5$ en levadura. En este trabajo mostraron que hay una inducción coordinada de los transcritos tanto de la ANJ1 como de la HSP70 durante el estrés térmico; sin embargo, sus patrones de expresión difieren bajo condiciones de NaCl, observando que la expresión de la ANJ1 se incrementa bajo condiciones de estrés salino, comparada con la HSP70 que no se induce (Zhu y col., 1993). Además, la sobreexpresión del gen *DnaJ* de *Arabidopsis* en *Escherichia coli* y en plantas de *Arabidopsis* exhiben tolerancia a estrés salino (Zhichang y col., 2010). Estos resultados indican que la expresión de los genes de las proteínas J son claves durante el estrés salino.

En *Arabidopsis thaliana*, la familia de las proteínas J (HSP40) es más grande (120 proteínas) que la familia de proteínas HSP70 (18 proteínas), y estas proteínas (HSP70/HSP40) constituyen una maquinaria de chaperonas que participan en el plegamiento de proteínas desplegadas; esto podría sugerir que las proteínas J podrían participar en una gran variedad de procesos celulares e interactuar con diferentes sustratos, siendo chaperonas multifuncionales.

En condiciones de estrés, la ATPasa- H^+ de la membrana plasmática juega un importante papel en la regulación de iones y transporte de metabolitos, y está involucrada en varios procesos fisiológicos que incluyen crecimiento celular, regulación del pH intracelular, entre otros. La actividad de la bomba de protones ATPasa- H^+ PM es controlada por un regulador negativo que es la proteína cinasa (PKS5) de *Arabidopsis*. Yang y col. (2010), reportaron que la proteína AtDJA3 activa la bomba de protones ATPasa- H^+ PM a través de la interacción directa con la proteína PKS5. Por lo tanto, las plantas que no expresan el gen *AtDJA3* son hipersensibles a sal en condiciones alcalinas y exhiben una reducción en la actividad de la bomba de protones. Sus resultados demostraron que la regulación de la actividad de la ATPasa- H^+ PM es activada por la proteína AtDJA3 por medio de la inactivación de la proteína cinasa PKS5. De esta manera, los resultados que

se obtuvieron en esta tesis de respuesta al estrés salino y osmótico en la línea mutante y líneas sobreexpresantes del gen *AtDJA3* en *Arabidopsis*, podría ser por la interacción entre esta proteína J con el regulador negativo de la cinasa PKS5 de la bomba de protones ATPasa-H⁺ PM (Yang y col., 2010). Por lo que una de las perspectivas de este trabajo es medir la actividad de la bomba de protones ATPasa-H⁺ PM, debido a la interacción de la proteína *AtDjA3* con el regulador negativo de la cinasa PKS5, con la finalidad de corroborar el fenotipo de sensibilidad y tolerancia de la línea mutante y líneas sobreexpresantes, respectivamente.

Recientemente se reportó que otro de los sustratos blancos de la proteína AtDJA3, la proteína de fase vegetativa corta (SVP). La transición del desarrollo vegetativo al reproductivo en *Arabidopsis* es controlado por una red compleja de rutas de floración, las cuales convergen en la regulación transcripcional de dos integradores de la ruta de floración, los cuales son el locus de floración T (FT) y el supresor de la expresión de constans 1 (SOC1). La proteína de fase vegetativa corta (SVP), actúa como un regulador de floración, el cual reprime la expresión de FT y SOC1 (Shen y col., 2011; Shen y Yu, 2011). Por consiguiente, la proteína AtDjA3 juega un papel esencial como regulador transcripcional mediando la integración de las señales de floración, ya que la pérdida de función de la proteína AtDjA3 retrasa la floración como resultado de la disminución de la expresión de SOC1 y FT (Shen y col., 2011; Shen y Yu, 2011). De esta manera, la proteína AtDjA3 interactúa con SVP en el núcleo y atenúa la capacidad de unión de SVP a las secuencias regulatorias de SOC1 y FT (Shen y col., 2011; Shen y Yu, 2011).

Sin embargo, hasta el momento hay pocos reportes de la relación entre la hormona ABA y las proteínas J. Kong y col. (2013), aislaron el gen *LeCDJ1*, el cual codifica para una proteína J de la clase Tipo III dirigida al cloroplasto de tomate (*Lycopersicon esculentum*), donde reportan que la expresión de *LeCDJ1* fue inducido en calor, NaCl, peróxido de hidrogeno (H₂O₂) y la aplicación de la hormona ABA (100 μM). De esta manera, nuestros resultados muestran que las

líneas mutantes de las proteínas J son sensibles a la hormona ABA, y al contrario las líneas transgénicas (*35S::AtDjA2* y *35S::AtDjA3*) presentan una insensibilidad a la aplicación de ABA.

Las proteínas de choque térmico (HSP), son importantes para la respuesta a estrés abiótico, sin embargo uno de los puntos clave será identificar sus posibles ligandos y/o proteínas blanco, tanto en condiciones sin estrés como en estrés.

VII. Conclusiones

Es de suma importancia identificar y caracterizar genes que podrían conferir tolerancia al estrés abiótico. Una de las principales respuestas es la inducción de genes que codifican proteínas de choque térmico (HSP), las cuales se consideran ser una respuesta universal bajo condiciones de estrés, y además se ha reportado su expresión durante diversas etapas de crecimiento y desarrollo de las plantas.

La caracterización del gen *OpsHSP18* de *Opuntia streptacantha* y de la secuencia parcial SSHPv-S38 de *Phaseolus vulgaris* L. de la variedad tolerante Pinto Villa, de la cual se identificaron los ortólogos AtDjA2 y AtDjA3 en *Arabidopsis thaliana*, proporcionan información importante con respecto a los mecanismos moleculares de la tolerancia al estrés en plantas. Además, los datos de tolerancia en germinación y los ensayos de supervivencia de plántulas bajo condiciones desfavorables, podría ayudar en la comprensión de la respuesta al estrés abiótico.

Sin embargo, existen muchas preguntas sin contestar acerca de los mecanismos que emplean estas proteínas, como:

¿Cuáles son los sustratos específicos de cada una de las HSP?, ¿Cómo eligen las HSP entre el replegamiento ó la degradación proteolítica de las proteínas dañadas?, ¿Cuáles son los mecanismos que presentan las HSP para elegir el destino de proteínas desplegadas?, ¿Qué determina que las HSP, transporten o importen a organelos a las proteínas blanco?, ¿Serán los mismos sustratos de las HSP bajo condiciones de desarrollo ó en estrés?, entre otros.

Todavía falta mucho por conocer y entender acerca de las funciones y mecanismos de las HSP, así como conocer sus proteínas blanco, y determinar si interactúan entre proteínas de las familias HSP, y también determinar su expresión en etapas de desarrollo ó en condiciones de estrés, entre otras, sin embargo en este trabajo se contribuyó al conocimiento del importante papel que juega la proteína *OpsHSP18* de nopal en la tolerancia al estrés abiótico, ya que al

sobreexpresar dicho gen en *A. thaliana*, favorece la germinación y el desarrollo de cotiledones verdes, así como en la supervivencia de plantas bajo condiciones de estrés (salino y osmótico). Además, las sobreexpresantes del gen *OpsHSP18* en *Arabidopsis* presentan un fenotipo de insensibilidad a ABA en germinación. Asimismo, en el caso de las proteínas J, se encontró que al sobreexpresar en *A. thaliana* ya sea el gen *AtDjA2* ó el *AtDjA3*, confieren tolerancia bajo condiciones de estrés salino y osmótico, y además nuestros datos sugieren una posible relación de la proteínas *AtDjA2* o el *AtDjA3* en la ruta de señalización del ABA.

Espero que los resultados que se obtuvieron en este trabajo, sea una motivación para continuar con el estudio de la expresión de estos genes bajo diferentes condiciones, analizar sus mecanismos de acción, determinar sus posibles sustratos de esta importante e interesante familia de proteínas, como lo son las proteínas de choque térmico (HSP).

VIII. Anexos

8.1 Materiales y Métodos

8.1.1 *Arabidopsis thaliana*

En el presente trabajo el material vegetal utilizado fue *Arabidopsis thaliana* ecotipo silvestre Col-0, una planta ampliamente empleada como un organismo modelo en biotecnología de plantas. Las semillas de las líneas utilizadas fueron adquiridas del *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC) de la Universidad del Estado de Ohio.

Las líneas mutantes Salk que presentan inserción de T-DNA de *A. thaliana* que se estudiaron y las que se generaron en el laboratorio para la ganancia ó pérdida de función, se describen en la tabla 2.

Tabla 2. Lista de semillas.

Gen	Clave	Origen	Características
Col-0	Ecotipo Columbia	Dr. Guzmán	Ecotipo silvestre (WT)
Proteína J: <i>AtDJA2</i>	Salk_071563	SALK	Inserción del T-DNA, ubicada en el primer intrón del gen <i>AtDJA2</i> (At5g22060), tipificada como línea homocigota (HM)
<i>AtDJA2</i>	Sobreexpresante	SSM	Gen <i>AtDJA2</i> (At5g22060) para la sobreexpresante en <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AtDJA3</i>	Salk_132923	SALK	Inserción del T-DNA, ubicada en el cuarto intrón del gen <i>AtDJA3</i> (At3g44110), tipificada como línea homocigota (HM)
<i>AtDJA3.1</i>	Sobreexpresante	SSM	Gen <i>AtDJA3.1</i> (At3g44110), versión que procesa el intrón (343 aa versión corta) de <i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>AtDJA3.2</i>	Sobreexpresante	SSM	Gen <i>AtDJA3.2</i> (At3g44110), versión que retiene el intrón (420 aa versión larga) de <i>Arabidopsis thaliana</i>
OpsHSP18: <i>OpsHSP18</i>	Sobreexpresante	SSM	Gen <i>OpsHsp18</i> de <i>Opuntia streptacantha</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> , se obtuvo de la SSH de Ochoa-Alfaro y col., 2012, Líneas sobreexpresantes 1-

<i>OpsHSP18</i>	Sobreexpresante	SSM	11 (F1) Gen <i>OpsHsp18</i> de <i>Opuntia streptacantha</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> , se obtuvo de la SSH de Ochoa-Alfaro y col., 2012, Líneas sobreexpresantes 3, 6 y 7 (F2 y 3)
-----------------	-----------------	-----	---

HM: Homocigota, SSM: Silvia Salas Muñoz, SALK: Signal Institute Genomic Analysis Laboratory, Dr. Plinio Antonio Guzmán Villate, Cinvestav, Unidad Irapuato, Guanajuato, México

8.1.2 Microorganismos

En el presente estudio los microorganismos utilizados fueron cepas bacterianas comúnmente empleadas para la transformación y amplificación de DNA recombinante, como cepas empleadas para la transformación genética de plantas (tabla 3).

Tabla 3. Lista de Microorganismos.

Microorganismo	Cepa	Temperatura	Crecimiento	Procedencia
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV2260	28 °C	48-72 h	Dr. Guzmán
<i>Escherichia coli</i>	TOP10	37 °C	12-16 h	Invitrogen (2004b)

Dr. Plinio Antonio Guzmán Villate, Cinvestav, Unidad Irapuato, Guanajuato, México.

8.1.3 Vectores

En este estudio se utilizaron diversos vectores los cuales se muestran en la tabla 4. Entre ellos, los vectores de entrada como el pCR[®]8/GW/TOPO[®], que combina las tecnologías TOPO[®] Cloning[®] TA y Gateway[®] (Invitrogen, 2004b) y está adaptado para permitir una fácil transferencia basada en la recombinación del producto de PCR de interés hacia los vectores destino Gateway[®]. Los vectores destino como el pMDC32 se utilizan para la expresión de genes de interés en diferentes organismos experimentales. Dichos genes son transferidos al vector destino mediante un proceso de recombinación homóloga por el reconocimiento de sitios específicos entre el vector de entrada y el destino empleando la enzima LR Clonasa[®] (Invitrogen, 2004a).

Tabla 4. Lista de Vectores.

Vector	Características	Proveedor
pCR [®] 8/GW/TOPO [®]	<ul style="list-style-type: none"> • Vector de clonación • Autoreplicativo • Origen de replicación para <i>E. coli</i> • Tamaño de 2,817 pb • Resistencia a espectinomicina 	Invitrogen (2006)
pMDC32	<ul style="list-style-type: none"> • Vector del sistema Gateway[®] • Vector de sobreexpresión • Autoreplicativo • Origen de replicación para <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> • Tamaño de 11,752 pb • Resistencia a kanamicina 	Invitrogen
pDHB1 (vector bait)	<ul style="list-style-type: none"> • Vector para el sistema de dos híbridos • Autoreplicativo • Origen de replicación para <i>E. coli</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i> • Tamaño de 8,961 pb • Resistencia a kanamicina 	DUALhunter kit user manual (2007)
pENTR223fi	<ul style="list-style-type: none"> • Plásmido G83687 • Autoreplicativo • Tamaño de 4,045 pb • Resistencia a espectinomicina 	Signal (2010)

A continuación se describen los vectores utilizados en este estudio:

1. **pCR[®]8/GW/TOPO[®] (pEntry) y pENTR223fi:** La tecnología de estos vectores, es facilitar la clonación de los productos de PCR en un solo paso dentro del vector con una eficiencia del $\geq 95\%$. Una de las características de la tecnología TOPO[®] Cloning TA, es proporcionar el vector abierto bordeado por residuos de timinas para la clonación del producto de PCR que tienen un residuo de adenina en cada extremo. Además, contienen el origen de replicación pUC que permite obtener un alto número de copias del plásmido en *E. coli*. Las clonas pueden ser fácilmente secuenciados ya que contiene sitios de unión a oligonucleótidos específicos localizados flanqueando el producto de clonación. Por otro lado, contienen los sitios

attL1 y *attL2* derivados del bacteriófago λ para recombinación del producto clonado hacia algún vector destino Gateway[®] (Invitrogen 2006).

2. **pMDC32**: Es un vector destino que cuenta con la tecnología Gateway[®] y permite la recombinación homóloga de productos de interés desde un vector de entrada al poseer los sitios *attR1* y *attR2* mediante la enzima LR Clonasa[®] (Invitrogen). Se caracteriza por ser un vector binario que permite la expresión de genes en plantas. Cuenta con el promotor 35S del virus del mosaico de coliflor, el cual es un promotor fuerte y constitutivo, lo que permite la expresión del gen de interés en todos los tejidos de la planta. Además, posee las secuencias del borde derecho (BD) y el borde izquierdo (LB) del T-DNA de *A. tumefaciens* que se encuentran flanqueando al inserto, lo que permite la integración del DNA de interés al genoma de la planta (Curtis y Grossniklaus, 2003). Contiene el gen de resistencia a higromicina, lo que permite la selección de las plantas transgénicas.

3. **pDHB1**: Este vector de *Saccharomyces cerevisiae*, se utiliza para el sistema de dos híbridos con la tecnología “split-ubiquitin”, fue diseñado para ensayos de escrutinio para identificar y caracterizar las interacciones proteína-proteína, entre proteínas asociadas a la membrana ó proteínas citosólicas. El sistema está basado en fusionar el gen o dominio de interés (“bait”, anzuelo) con la mitad de la región C-terminal de la ubiquitina (Cub) y al factor de transcripción LexA-VP16. Este vector se caracteriza por tener sitios *Sfi1* que son poco frecuentes en los genomas de eucariotes y en procariotes, por lo tanto, esto facilita la clonación direccional el gen de interés para la construcción del vector “bait” (Manual del kit DUALhunter; Biotech Dualsystems, 2007).

Las construcciones obtenidas en este estudio a partir de los vectores mencionados anteriormente, se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Lista de construcciones.

Gen	Vector	Cepa	Resistencia	Característica
AtDjA2				
Sobreexpresante	pENTR223fi	<i>E. coli Top-10</i>	E	ORF del gen de <i>AtDjA2</i> (At5g22060) de <i>A. thaliana</i> , con un tamaño de 1,267 pb
	pMDC32	<i>E. coli Top-10</i>	K	
	pMDC32	<i>A. tumefaciens</i> GV2260	K/R/A	
S2H	pDHB1	<i>E. coli Top-10</i>	K	ORF del gen de <i>AtDjA2</i> (At5g22060) de <i>A. thaliana</i> , para el sistema de dos híbridos en levadura, con un tamaño de 1,301 pb
	pDHB1	<i>S. cerevisiae</i> NMY51	K	
AtDjA3				
Sobreexpresante AtDjA3.1	pCR [®] 8/GW/TOPO [®]	<i>E. coli Top-10</i>	E	ORF del gen de <i>AtDjA3</i> (At3g44110) versión que procesa el intrón (<i>AtDjA3.1</i> , versión corta) de <i>A. thaliana</i> , con un tamaño de 1,032 pb
	pMDC32	<i>E. coli Top-10</i>	K	
	pMDC32	<i>A. tumefaciens</i> GV2260	K/R/A	
Sobreexpresante AtDjA3.2	pCR [®] 8/GW/TOPO [®]	<i>E. coli Top-10</i>	E	ORF del gen de <i>AtDjA3</i> (At3g44110) versión que retiene el intrón (<i>AtDjA3.2</i> , versión larga) de <i>A. thaliana</i> , con un tamaño de 1,290 pb
	pMDC32	<i>E. coli Top-10</i>	K	
	pMDC32	<i>A. tumefaciens</i> GV2260	K/R/A	
OpsHSP18				
Sobreexpresante	pCR [®] 8/GW/TOPO [®]	<i>E. coli Top-10</i>	E	ORF del gen OpsHSP18 de <i>O. streptacantha</i> , para la sobreexpresión en <i>A. thaliana</i> , con un tamaño de 492 pb
	pMDC32	<i>E. coli Top-10</i>	K	
	pMDC32	<i>A. tumefaciens</i> GV2260	K/R/A	
S2H	pDHB1	<i>E. coli Top-10</i>	K	ORF del gen OpsHSP18 de <i>O. streptacantha</i> , para el sistema de dos híbridos en levadura, con un tamaño de 527 pb
	pDHB1	<i>S. cerevisiae</i> NMY51	K	

S2H: Sistema de dos híbridos, ORF: Marco de lectura abierto, E: Espectinomicina, K: Kanamicina, R: Rifampicina

8.1.3 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo se diseñaron para la amplificación específica de productos de PCR de interés empleando el programa Editseq (DNASTAR versión 7.0; 2006), los criterios que se tomaron en cuenta para el diseño de los oligonucleótidos enlistados en la tabla 6 son: temperatura de alineamiento similar entre cada pareja de oligonucleótidos (± 2 °C) y la ausencia de formación de estructura secundaria entre ellos.

Tabla 6. Lista de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes.

Gen	Nombre	Secuencia	Tm °C	Tamaño del amplicón (pb)
<i>AtDjA2</i>				
Línea insercional	LP'071563	5'-GGATTCTGATTGATAAAAAGAAAA CC-3'	59.68	986
	RP'071563	5'-TCACGCTTCTCAGGATCACTTAAA-3'	61.15	
RT-PCR	LP'AtDjA2	5'-CAACATGCGCATCTTAGTGATCT-3'	60.99	136
	RP'AtDjA2	5'-GGTGTAAACAAGGATTTGAATTAGG-3'	59.44	
<i>AtDJA2</i>	LP'AtDjA2	5'-AACATGTTTGAAGAGGACCTTC-3'	60.99	1,260
	RP'AtDjA2	5'-ATGTTGATCACTGCTGGGCACAT-3'	62.77	
S2H	LP'AtDjA2S2H	5'-ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGTT TGGAAGAGGACCTTC-3'	71.70	1,301
	RP'AtDjA2S2H	5'-AACTGATTGGCCGAGGCGGCAACT GCTGGGCACATTGC-3'	77.31	
<i>AtDjA3.1</i>				
Línea insercional	LP'132923	5'-CTTGAAGGTATCTCTTGAGGATGTGT ACC-3'	66.04	833
	RP'132923	5'-GACGATGCATCTGAATACGTACCA GG-3'	66.17	
RT-PCR	LP'132923	5'-GTAACCTCTTAGAGAGACTTTG-3'	61.15	257
	RP'132923	5'-CACACAGTATATATGTTCTTAGACA-3'	58.02	
	LP'AtDjA3.1	5'-ATGTTCCGGTAGAGGACCCTCGAAG AAGAG-3'	68.87	
<i>AtDjA3.1</i>	RP'AtDjA3.1	5'-TTCCTCCTCATCCTTCATGAATGGC CTCTGGT-3'	69.78	
	RP'AtDjA3.1	5'-TCATAAGCCTCTCTTTGAGCTTG CCTTCCTCCTCATCCTTCAT-3'	72.92	
<i>AtDjA3.2</i>	LP'AtDjA3.2	5'-GGCGAAAAGATGTTCCGGTAGAG G-3'	64.55	1,290
	RP'AtDjA3.2	5'-GTCTCTCTAAGGAGTTACTTACTG C-3'	62.94	
<i>OpsHSP18</i>				
ORF	LP'sHsp18	5'-ACCATGTCGCTAATTCCAAG-3'	58.35	492
	RP'sHsp18	5'-GATATCTCTGGGAATAAAGG-3'	58.66	
S2H	LP'sHsp18S2H	5'-GGCCATTACGGCCATGTCGCTAATT	73.93	527

	RP'sHsp18S2H	CCAAGCTTCTTTGGC-3' 5'-GGCCGAGGCGGCCAAGTTCCCAGA GATATCAATGGTCTTCA-3'	75.70	
Otros				
GW1	LP'GW1	5'GTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC 3'	61.30	
Vector pDHB1	LP'pDHB1	5'-TTTCTGCACAATATTTCAAGCATACC-3'	59.86	1576
	RP'pDHB1	5'-GATGTAAGGTGGACTCCTTCT-3'	60.61	
Actina	LP'Act8	5'-GCCAGTGGTCGTACAACCG-3'	64.48	217
	RP'Act8	5'-CACGACCAGCAAGGTCGAGACG-3'	68.26	
Adenina fosforribosil transferasa 1	LP'Apt1	5'-GTCATCCCCGACTTCCCTAA-3'	62.45	138
	RP'Apt1	5'-ACCTGCAACAACAGATATGCCT-3'	60.81	
LB1	LP'LB1	5'-AGCAAGCGGTCCACGCTGGTTT-3'	62	195

S2H: Sistema de dos híbridos, TM: Temperatura de alineamiento, pb: Pares de bases, LP:

8.1.4 Manipulación de tejido vegetal

8.1.4.1 Esterilización de semillas

Las semillas de *Arabidopsis* fueron esterilizadas con 500 µl de cloro al 20% (v/v) a partir de hipoclorito de sodio comercial al 6%, durante 5 minutos, tratando de no excederse de los 5 minutos para evitar dañar el embrión y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril (500 µl) 5 veces para eliminar residuos de cloro.

8.1.4.2 Germinación de semillas

En placas de medio MS se sembraron las líneas mencionadas anteriormente (tabla 1), mediante puntas de micropipetas se colocaron en la placa para la germinación, en condiciones de esterilidad, posteriormente se incubaron a 4 °C durante dos días para su sincronización. Después se colocaron en la cámara bioclimática con un fotoperíodo de 16/8 h luz/obscuridad, temperatura 22 ± 2 °C, y se fueron monitoreando para pasarse a tierra para la obtención de semillas (T2 o T3).

Para los experimentos de germinación, las semillas de Col-0, líneas mutantes de T-DNA y líneas sobreexpresantes (35S) de *Arabidopsis thaliana*, fueron

germinadas bajo diferentes condiciones de estrés y en la presencia de la fitohormona ABA. El efecto de estrés salino en germinación fue evaluado en medio MS 0.5x suplementado con 0, 125, 150 y 175 mM NaCl. El efecto de estrés osmótico en germinación fue evaluado en medio MS 0.5x sin sacarosa y suplementado con glucosa (0, 221, 277, 333 y 388 mM) o manitol (0, 219, 274, 329 y 383 mM). Estas concentraciones fueron equivalentes a 0, 4, 5, 6 y 7% de cada azúcar (Zhao y col., 2011). También se germinaron en presencia de diferentes concentraciones de ABA (0, 1, 3, 4, 5 y 7 μ M).

8.1.5 Técnicas de transformación genética

8.1.5.1 Transformación de células bacterianas

Para la transformación genética se utilizaron tanto células electrocompetentes de *E. coli* como de *A. tumefaciens*, empleando plásmidos purificados ó mezclas de ligación. El método de transformación se llevó a cabo conforme a las recomendaciones de la casa comercial Invitrogen, y en cuanto a las condiciones de electroporación se siguieron las especificaciones del manual proporcionado por el fabricante (Electroporator 2510; Eppendorf).

8.1.5.2 Transformación de *Arabidopsis thaliana*

La transformación genética de *A. thaliana* fue realizada utilizando como sistema de transformación a la bacteria de *A. tumefaciens* usando el método “Floral dip” descrito por Zhang y col. (2006). Para la transformación de *Arabidopsis*, el primer paso es verificar el inserto de interés en un vector binario dentro de la cepa de *A. tumefaciens*, después se inocula la cepa en 3 ml de medio LB líquido, el cual contiene los antibióticos apropiados para la selección del vector binario y para la bacteria, el cultivo se incuba a 28 °C durante 2 días. Posteriormente, a partir de este cultivo con una densidad óptica (OD) de 0.2 se inocula en 70 ml de LB líquido con los antibióticos de selección, se crece a 28 °C por 5 o 6 h, hasta tener un OD

de 0.6 para la transformación genética. Una vez que se tiene la OD, se centrifuga para obtener la pastilla de las células de *Agrobacterium* y se resuspende la pastilla de células en 100 ml de la solución de transformación. Enseguida se prepara la maceta con 16 plantas de *A. thaliana* aproximadamente de 4 semanas de edad, antes de la inflorescencia, en el caso de que las plantas presenten flores o silicuas maduras se cortan antes de la transformación. Entonces, enseguida se invierten las plantas en la solución de transformación con la suspensión de bacterias durante 15 s. Una vez que transcurrieron los 15 s se colocan en obscuridad, con la finalidad de mantener la humedad durante 16 a 24 h. Transcurridas las 24 h, se cambian a una cámara con un fotoperíodo de 16/8 h luz/obscuridad, hasta la obtención de semillas transgénicas.

8.1.5.3 Selección de líneas transgénicas de la transformación de *A. thaliana*

Para la identificación de plántulas transgénicas se ha desarrollado un método rápido en 3.25 días para la selección de las plántulas. El método consiste esterilizar las semillas (apartado 3.4.1), y colocarlas en medio MS el cual contiene el antibiótico de selección (higromicina). Las semillas son estratificadas durante 2 días, posteriormente se sometieron a un régimen de 4 a 6 h luz, 48 h obscuridad y 24 h luz para su selección, las plántulas resistentes a higromicina se identificaron mediante el tamaño del hipocotilo, el cual es más grande comparado con las que no son resistentes (Harrison y col., 2006).

8.1.6 Técnicas moleculares

8.1.6.1 Extracción de DNA genómico de hojas de *Arabidopsis thaliana*

La extracción se llevó a cabo de la siguiente forma: en tubos eppendorf de 1.5 ml se les agrega perlitas de vidrio de 425 a 600 μM (Glass Beads Sigma unwashed) hasta la marca de los 100 μl del tubo, y después se introduce en el tubo, una hoja basal grande o dos hojas basales medianas de la roseta, para congelarla inmediatamente en nitrógeno líquido, se mantiene a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesamiento.

Posteriormente, para la homogenización del tejido se utilizó el aparato Minibeadbeater (Biospec products) durante 15 a 20 s en la máxima potencia, se agregó 300 μl del buffer CTAB 2X se mezcló por vortex, enseguida se colocaron a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ aproximadamente de 10 a 20 min. Las muestras se dejan enfriando a temperatura ambiente, se les adicionó 300 μl de cloroformo y se mezcló con vortex y se centrifugaron de 2 a 3 min. Enseguida se transfirió la fase acuosa a tubos eppendorf, añadiendo 300 μl de isopropanol frío, se mantuvo en hielo durante 15 min, a continuación se centrifugaron 5 min y se desechó el sobrenadante. El pellet se lavó con etanol al 70%, se centrifugó 5 min y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. Finalmente se resuspendió la pastilla en 10 a 30 μl de agua miliQ (dependiendo del tamaño de la pastilla) y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

8.1.6.2 Extracción del DNA plasmídico de células bacterianas

Para el aislamiento del DNA plasmídico de células de *E. coli* y *A. tumefaciens* se utilizó la técnica lisis alcalina descrita por Birnboim y Doly (1979) con algunas modificaciones.

8.1.6.3 Extracción de RNA de *Arabidopsis thaliana*

Para la extracción de RNA, se tomaron hojas de la roseta de la planta, para congelarlas y pulverizarlas con nitrógeno líquido. Se añadió 500 µl del reactivo de RNA (Concert™ Plant RNA Reagent; Invitrogen, 2001), mezclándose con vortex hasta homogenizar la mezcla y se deja reposando 5 min a temperatura ambiente, se centrifugaron 4 min a 13,400 rpm. Después, se transfirió el sobrenadante a un tubo libre de RNAasa, agregando 100 µl de NaCl 5 M y 300 µl de cloroformo, se mezclaron por inversión. Después se centrifugaron durante 13 min a 13,400 rpm y la fase acuosa se transfirió a un tubo libre de RNAasa. Para precipitar se le adicionó un volumen equivalente de isopropanol y se dejó 10 min a temperatura ambiente, después se centrifugo durante 12 min a 13,400 rpm. Para lavar la pastilla, se agregó 1 ml de etanol al 75% y se centrifugó durante 1 min a 13,400 rpm. Finalmente, se agregaron de 10 a 30 µl de agua libre de RNAasa, mezclando pro inversión para disolver el RNA. Se almacenó el RNA a -70 °C hasta su procesamiento.

8.1.6.4 Digestión del DNA con enzimas de restricción

Las reacciones con enzimas de restricción se llevaron a cabo conforme a las recomendaciones de las casas comerciales (Invitrogen y Biolabs). Las digestiones se realizaron a partir del DNA plasmídico. En la mezcla de reacción se utilizaron de 2-5 unidades de enzima por µg de DNA plasmídico.

8.1.6.5 Reacción de ligación de DNA

La ligación del vector con el inserto, se llevó a cabo mediante la relación molar del vector y el inserto de 1:3. La ligasa que se utilizó fue DNA ligasa del fago T4 (Clontech). Al igual otro de los procedimientos de ligación que se utilizaron se describen en el manual de Invitrogen (2006), que se utiliza para la clonación TOPO® TA Cloning®.

8.1.6.6 Recombinación del Sistema Gateway® mediante la enzima LR Clonasa® II

La recombinación homóloga se llevó a cabo mediante la enzima LR Clonasa® II, siguiendo las recomendaciones del manual Invitrogen (2004a). El sistema Gateway®, es un sistema de recombinación de sitios específicos del bacteriófago lambda. El plásmido recombinante del vector de entrada (pEntry) contiene el DNA de interés, flanqueado por secuencias de recombinación *attL*, estos sitios se recombinan con sitios *attR* del vector destino (pMDC32), utilizando la mezcla de reacción de la LR Clonasa® (Invitrogen). Esta reacción transfiere la secuencia de interés al vector destino deseado. En el vector destino contiene un gen (*ccdB*) que es letal para la mayoría de las cepas de *E. coli* (Fig. 27; Earley y col., 2006). Esta selección negativa, combinado con la selección positiva del marcador de resistencia a un antibiótico, asegura que las colonias resultantes contienen el plásmido que ha sido objeto a la recombinación. La recombinación fue realizada respecto a una relación molar entre el vector e inserto (1:3).

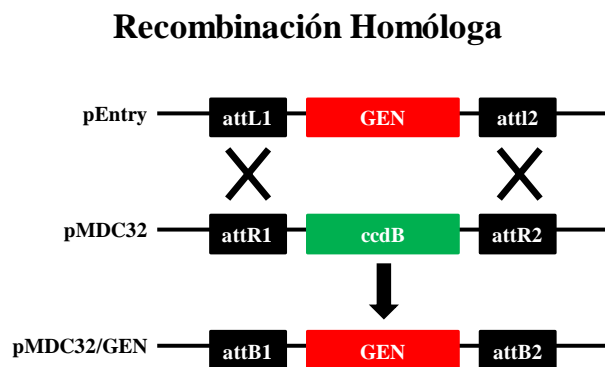


Figura 27. Recombinación del Sistema Gateway® mediante la enzima LR Clonasa® II. Recombinación entre los sitios *attL* del vector de entrada y los sitios *attR* del vector destino mediante la enzima LR Clonasa® (Earley y col., 2006).

8.1.6.7 Purificación de DNA por columna

La purificación del producto de PCR se llevó a cabo por columna de DNA utilizando un kit de purificación (Promega, 2009).

8.1.6.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para la amplificación de los genes en este estudio, se utilizó un termociclador (Applied Biosystems), usando diferentes Taq polimerasas como, la Taq Phusion, High-Fidelity PCR Master Mix (Finnzymes, 2009), HotStar HiFidelity PCR (Quiagen, 2008) y una Taq polimerasa casera. Las condiciones de PCR fueron 5 min a 94 °C para la primera desnaturalización, 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 45 s a 58 °C a 72 °C temperatura de alineamiento de los oligonucleótidos (esto depende de los oligonucleótidos a utilizar para la reacción) y 1 min 15 s a 72 °C y por último 5 min a 72 °C para la extensión final. La mezcla de reacción contenía 100 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos, 10-30 ng de DNA, 20 pmoles de dNTPs y 1.5 unidades de Taq polimerasa, en un volumen final de 50 µl.

8.1.6.9 Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

El RNA total de las muestras de las líneas de *A. thaliana* se cuantificaron en el Biofotometro (Eppendorf), y a continuación fueron tratadas con 0.5 µl de DNAsa (Ambion), 1 µl buffer 10X, y el resto de agua dietilpirocarbonato (DEPC) hasta que el volumen fuera de 10 µl. Se incubaron a 37 °C durante 10 min y se inactivó con 1 µl de EDTA 5 mM a 75 °C por 10 min. La síntesis de la primer cadena de cDNA fue realizada mediante el kit SuperScript[®] First Strand Synthesis System (SSII) para RT-PCR (Invitrogen, 2003). Primero se realizó la mezcla con 1 µl oligonucleótido DT, 1 µl dNTPs y 1 µl de agua de DEPC, esta mezcla fue incubada a 65 °C durante 5 min. A esta mezcla se le agregó 3 µl de buffer 10X RT-PCR, 6 µl de MgCl₂ 25 mM, 3 µl de DTT y 1 µl de RNAsa out Recombinant Ribonuclease Inhibitor, enseguida la mezcla de reacción final fue incubada a 42 °C por 2 min (en este paso se le agrega 1 µl de enzima SSII), el programa en el termociclador sigue a 42 °C por 50 min y finalmente a 70 °C durante 15 min y el cDNA se guardó a -20 °C para su posterior análisis.

8.1.6.10 Tiempo real de la transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (qRT-PCR)

Los experimentos de tiempo real de RT-PCR se realizaron en una mezcla de 10 μ l de reacción compuesta de 5 μ l del Mix RT.PCR Power SYBR[®] Green (2x), 200 nM de cada oligonucleótido, 50 ng de RNA y 0.08 μ L del Mix de Enzima RT (125X) de StepOne RT-PCR, siguiendo las sugerencias del fabricante (Applied Biosystems) y usando el Sistema de Detección StepOne Real-Time PCR y el Software v2.1 StepOne (Applied Biosystems). Las condiciones de los ciclos térmicos consistieron de 30 min a 48 °C (síntesis de cDNA), 10 minutos a 95 °C (activación de AmpliTaq Gold[®] ADN polimerasa) seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C para desnaturalización, y de alineamiento y extensión de 1 min a 60 °C.

IX. Referencias

- Acosta-Gallegos, J. A., and White, J. W. 1995. Phenological plasticity as an adaptation by common bean to rainfed environments. *Crop Sci.* 35: 199-204.
- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., Scherer, E. E., Li, P. W., Hoskins, R. A., Galle, R. F., George, R. A., Lewis, S. E., Richards, S., Ashburner, M., Henderson, S. N., Sutton, G. G., Wortman, J. R., Yandell, M. D., Zhang, Q., Chen, L. X., Brandon, R. C., Rogers, Y. H. C., Blazej, R. G., Champe, M., Pfeiffer, B. D., Wan, K. H., Doyle, C., Baxter, E. G., Helt, G., Nelson, C. R., Miklos, G. L. G., Abril, J. F., Agbayani, A., An, H. J., Pfannkoch, C. A., Baldwin, D., Ballew, R. M., Basu, A., Baxendale, J., Bayraktaroglu, L., Beasley, E. M., Beeson, K. Y., Benos, P. V., Berman, B. P., Bhandari, D., Bolshakov, S., Borkova, D., Botchan, M. R., Bouck, J., Brokstein, P., Brottier, P., Burtis, K. C., Busam, D. A., Butler, H., Cadieu, E., Center, A., Chandra, I., Cherry, J. M., Cawley, S., Davenport, L. B., Davies, P., de Pablos, B., Delcher, A., Deng, Z., Mays, A. D., Dew, I., Dietz, S. M., Dodson, K., Doup, L. E., Downes, M., Dugan-Rocha, S., Dunn, P., Durbin, K. J., Evangelista, C. C., Ferraz, C., Fleischmann, W., Fosler, C., Gabrielian, A. E., Garg, N. S., Gelbart, W. M., Glasser, K., Glodek, A., Gong, F., Gorrell, J. H., Gu, Z., Gu, P., Harris, M., Harris, N. L., Harvey, D., Heiman, T. J., Hernandez, J. R., Houck, J., Hostin, D., Houston, K. A., Howland, T. J., Wei, M. H., Ibegwam, C., Jalali, M., Kalush, F., Karpen, G. H., Ke, Z., Kennison, J. A., Ketchum, K. A., Kimmel, B. E., Kodira, C. D., Kraft, C., Kravitz, S., Kulp, D., Lai, Z., Lasko, P., Lei, Y., Levitsky, A. A., Li, X., Li, Z., Liang, Y., Lin, X., Liu, X., Mattei, B., McIntosh, T. C., McLeod, M. P., McPherson, D., Merkulov, G., Milshina, N. V., Mobarry, C., Morris, J., Moshrefi, A., Mount, S. M., Moy, M., Murphy, B., Murphy, L., Muzny, D. M., Nelson, D. L., Nelson, D. R., Nelson, K. A., Nixon, K., Nusskern, D. R., Pacleb, J. M., Palazzolo, M., Pittman, G. S., Pan, S., Pollard, J., Puri, V., Reese, M. G., Reinert, K., Remington, K., Saunders, R. D. C., Scheeler, F., Shen, H., Shue, B. C., Sidén-Kiamos, I., Simpson, M., Skupski, M. P., Spier,

- E., Spradling, A. C., Stapleton, M., Strong, R., Sun, E., Svirskas, R., Tector, C., Turner, R., Venter, E., Wang, A. H., Wang, Z. Y., Wassarman, D. A., Weinstock, G. M., Weissenbach, J., Williams, S. M., Woodage, T., Worley, K. C., Wu, D., Yang, S., Yao, Q. A., Ye, J., Yeh, R. F., Zaveri, J., Zhan, M., Zhang, G., Zhao, Q., Zheng, L., Zheng, X. H., Zhong, F. N., Zhong, W., Zhou, X., Zhu, S., Zhu, X., Smith, H. O., Gibbs, R. A., Myers, E. W., Rubin, G. M., Venter, J. C. M. 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185-2195.
- Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Sahi, C., Gallie, D. R., and Grover, A. 2001. *Arabidopsis thaliana* Hsp100 proteins: kith and kin. *Cell Stress Chaperones*. 6:219-224.
- Aguado-Santacruz, G.A. and García-Moya, E. 1998. Environmental factors and community dynamics at the southernmost part of the North American Graminetum I. On the contribution of climatic factors to temporal variation in species composition. *Plant Ecology* 135:13-29
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Lisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadriab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C., Ecker, J. R. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301:653-657.
- Assab, E., Rampino, P., Mita, G., and Perrotta, C. 2011. Heat shock response in olive (*Olea europaea* L.) twigs: Identification and analysis of a cDNA coding a class I small heat shock protein. *Plant Biosyst.* 145:419-425.

- Bagneris, C., Bateman, O. A., Naylor, C. E., Cronin, N., Boelens, W. C., Keep, N. H., and Slingsby, C. 2009. Crystal structures of alpha-crystallin domain dimers of alphaB-crystallin and Hsp20. *J. Mol. Biol.* 392:1242-1252.
- Barbera, G. 1995. History, economic and agro-ecological importance. In: Barbera G, Inglese P, Pimienta EB and Arias JE. (Eds.). *Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear*. FAO. Roma, Italy. 1-11 pp.
- Basha, E., O'Neill, H., and Vierling, E. 2012. Small heat shock proteins and α -crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem. Sci.* 37:106-117.
- Biotech Dualsystems, 2007. DUALhunter kit user manual. P01005. 1-46 pp.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-1523.
- Bondino, H. G., Valle, E. M. and Ten Have, A. 2011. Evolution and functional diversification of the small heat shock protein/ α -crystallin family in higher plants. *Planta.* 235:1299-1313.
- Boonsirichai, K., Sedbrook J. C., Chen, R., Gilroy, S., and Masson, P. H. 2003. ARG1 is a peripheral membrane protein that modulates gravity induced cytoplasmic alkalinization and lateral auxin transport in plant statocytes. *Plant Cell.* 15:2612-2625.
- Boston, R. S., Viitanen, P. V., and Vierling, E. 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* 32:191-222.
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J., and Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. W Gruissem, B Buchannan, R Jones, (eds.) American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. 1158-1249 pp.
- Brodsky, J. L. and Schekman, R. 1993. A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J. Cell Biol.* 123:1355-1363.
- Bukau, B., and Horwich, A. L. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell Press.* 92:351-366.

- Bukau, B., Schmid, F. X., and Buchner, J. 1999. Regulation, Cellular Function and Mechanism. In: Molecular Chaperones and Folding Catalysts. Bukau, B. (ed.) 3-10 pp. Harwood Academic Publishers, Amsterdam.
- Carver, J. A., Esposito, G., Schwedersky, G., and Gaestel, M. 1995. ¹H NMR spectroscopy reveals that mouse Hsp25 has a flexible C-terminal extension of 18 amino acids. FEBS Lett. 369:305-310.
- Caspers, G. J., Leunissen, J. A. M., and de Jong, W. W. 1995. The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved α -crystallin domain. J. Mol. Evol. 40:238-248.
- Chang, Z., Primm, T. P., Jakana, J., Lee, I. H., Serysheva, I., Chiu, W., Gilbert, H. F., and Quioco, F. A. 1996. *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure *in vitro* to suppress thermal aggregation. J. Biol. Chem. 271:7218-7223.
- Cheetham, M. E. and Caplan A. J. 1998. Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. Cell Stress Chaperones 3:28-36.
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J., and Kim, S. Y. 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. J. Biol. Chem. 275:1723-1730.
- Coca, M. A., Almoguera, C., and Jordano, J. 1994. Expression of sunflower low-molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. Plant Mol. Biol. 25:479-92.
- Craig, E. A., Huang, P., Aron, R., and Andrew, A. 2006. The diverse roles of J-proteins, the obligate Hsp70 co-chaperone. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 156:1-21.
- Curtis, M. D. and Grossniklaus, U. 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. Plant Physiol. 133: 462-469.
- Debouck, D. G. 1999. Diversity in *Phaseolus* species in relation to the common bean. In: Common Bean Improvement in the Twenty-First Century, S. P. Singh, ed., Kluwer Academic Publ., Dordrecht, the Netherlands. 25-52 pp.

- Delgado-Salinas A. 1985. Systematics of the genus *Phaseolus* in Mexico and Central America. Ph.D. dissertation, University of Texas, Austin.
- DeRocher, A. E. and Vierling, E. 1994. Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation. *Plant J.* 5:93-102.
- Doyle, S. M. and Wickner, S. 2008. Hsp104 and ClpB: protein disaggregating machines. *Trends Biochem. Sci.* 34:40-48.
- Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., and Pikaard, C. S. 2006. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *Plant J.* 45:616-629.
- Ehrensperger, M., Lilie, H., Gaestel, M., and Buchner, J. 1999. The dynamics of Hsp25 quaternary structure—structure and function of different oligomeric species. *J. Biol. Chem.* 274:14867-14874.
- Ellis, R. J. 1990. The molecular chaperone concept. *Semin. Cell Biol.* 1:1-9.
- Estrella, V. R., Barkla, B. J., Bohnert, H. J., and Pantoja, O. 2004. Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. *Plant Physiol.* 135:2318-2329.
- Fink, A. L. 1999. Chaperone-mediated protein folding. *Physiol. Rev.* 79: 425-449.
- Finnzymes Oy Phusion[®], 2009. High-Fidelity PCR Master Mix. Tools for Molecular Biology. Disponible en: www.finnzymes.com. Accesado: 17/04/2009.
- Flores-Valdes, C., Luna-Esquivel J. M., and Ramírez-Moreno, P. P. 1995. Mercado Mundial de la Tuna. Apoyos y Servicios a la Comercialización Agropecuaria (ASERCA). Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Centro de Investigaciones Económicas, Sociales y Tecnológicas de la Agroindustria y de la Agricultura Mundial (CIESTAAM). 173 p.
- Frazier, A. E., Dudek, J., Guiard, B., Voos, W., Li, Y., Lind, M., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H. E., Bilanchone, V., Cumsky, M. G., Truscott, K. N., Pfanner, N., and Rehling, P. 2004. Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11:226-233.
- Friedrich K. L., Giese, K. C., Buan, N. R., and Vierling, E. 2004. Interactions between small heat shock protein subunits and substrate in small heat shock protein-substrate complexes. *J. Biol. Chem.* 279:1080-1089.

- Garrett, J. L. and Vierling, E. 2000. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol.* 122:189-197.
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Peres Ben Zvi, A., Tomoyasu, T., and Bukau, B. 1999. Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:13732-13737.
- González-Durán, A., Riojas-López, M. E., and Arreola-Nava, H. J. 2001. El género *Opuntia* en Jalisco (Guía de campo). Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. 135 p.
- Grahan, P. H. and Ranalli, P. 1997. Common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Field Crops Res.* 53:131-146.
- Greenway, H. and Munns, H. 1980. Mechanisms of salt tolerance in nonhalophytes. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 31:149-190.
- Gupta, S. C., Sharma, A., Mishra, M., Mishra, R. K., and Chowdhuri, D. K. 2010. Heat shock proteins in toxicology: How close and how far? *Life Sci.* 86:377-384.
- Hahn, A., Bublak, D., Schleiff, E., and Scharf, K. D. 2011. Crosstalk between Hsp90 and Hsp70 chaperones and heat stress transcription factors in tomato, *Plant Cell.* 23:741-755.
- Harrison, S. J., Mott, E. K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J. C., and Cottage, A. 2006. A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods.* 2:19. Doi: 10.1186/1746-4811-2-19.
- Hartl, F. U. and Hayer-Hartl, M. 2002. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science.* 295: 1852-1858.
- Haslbeck, M., Franzmann, T., Weinfurtner, D., and Buchner, J. 2005. Some like it hot: The structure and function of small heat-shock proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12:842-846.

- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, H. R., Saibil, S. X., and Buchner, J. 1999. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J.* 18:6744-6751.
- Hendrick, J. P. and Hartl, F. U. 1993. Molecular chaperone functions of heatshock proteins. *Ann. Rev. Biochem.* 62:349-384.
- Hernández-Lucero E., Ruíz, O. A., and Jimenez-Bremont, J. F. 2008. Effect of salt stress on polyamine metabolism in two bean cultivars. *Plant Stress.* 2:96-102.
- Hernández-Lucero, E., Rodríguez-Hernández, A. A., Ortega-Amaro, A., Jiménez-Bremont, J. F. 2013. Differential expression of genes for tolerance to salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Mol. Biol. Rep.* DOI 10.1007/s11105-013-0642-8.
- Hirt, H. and Shinozaki, K. 2003. Plant responses to abiotic stress. *Top. Curr. Gen.* 4:73-101.
- Hu, Y., Zhou, Z., Huang, X., Xu, M., Lu, L., Xu, Z., Li, J., and Sha, J. 2004. Expression of a novel DnaJA1 alternative splicing in human testis and sperm. *Int. J. Androl.* 27:343-349.
- Invitrogen™ 2006. pCR®8/GW/TOPORTA Cloning® Kit. Five-minute, TOPOR Cloning of Taq polymerase-amplified PCR into an entry vector for the Gateway® System. Catalog No. K2500-20, K2520-20, and K2520-02. User Manual. Version E. 32 p.
- Invitrogen™. 2001. Concert™ Plant RNA Reagent. Small Scale RNA Isolation. Catalog No. 12322-012. 4-5 pp.
- Invitrogen™. 2003. SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR. Catalog no. 11904-018. Version E. 26 p.
- Invitrogen™. 2004a. Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix. Catalog No. 11791-020 and 11791-100. 4 p.
- Invitrogen™. 2004b. One Shot® TOP10 Competent Cells. Catalog No(s). C4040-10, C4040-03, C4040-06, C4040-50, and C4040-52. Version M. 11 p.
- Jaya, N., Garcia, V., and Vierling, E. 2009. Substrate binding site flexibility of the small heat shock protein molecular chaperones. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 106:15604-15609.

- Jiménez-Bremont, J. F., Becerra-Flora, A., Hernández-Lucero, E., Rodríguez-Kessler, M., Acosta-Gallegos, J. A., and Ramírez-Pimentel, J. G. 2006. Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine. *Biol. Plantarum* 50:763-766.
- Kadota, Y. and Shirasu, K. 2012. The HSP90 complex of plants. *BBA–Mol. Cell Res.* 1823:689-697.
- Khanna-Chopra, R. and Sinha, S. K. 1998. Prospects of success of biotechnology approaches for improving tolerance to drought stress in crop plants. *Curr. Sci.* 74:25-34.
- Kilstrup, M., Jacobsen, S., Hammer, K., and Vogensen, F. K. 1997. Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63:1826-1837.
- Kim, K. K., Kim, R., and Kim, S. H. 1998. Crystal structure of a small heat-shock protein. *Nature* 394:595-599.
- Ki-Won, L., Joon-Yung, C., Kyung-Hee, K., Yong-Goo, K., Byung-Hyun, L., and Sang-Hoon, L. 2012. Overexpression of alfalfa mitochondrial HSP23 in prokaryotic and eukaryotic model systems confers enhanced tolerance to salinity and arsenic stress. *Biotechnol. Lett.* 34:167-174.
- Knight, H. and Knight, M. R. 2001. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* 6:262-267.
- Kong, F., Deng, Y., Wang, G., Wang, J., Liang, X. y Meng, Q. 2013. LeCDJ1, a chloroplast DnaJ protein, facilitates heat tolerance in transgenic tomatoes. *J. Integrative Plant Biol.* DOI: 10.1111/jipb.12119.
- Koornneef, M. and Meinke, D. 2010. The development of *Arabidopsis* as a model plant. *Plant J.* 61:909-921.
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., Koskull-Döring, P. V., Vierling, E., and Scharf, K.D. 2007. Complexity of the heat stress response in plants. *Curr. Op. Plant Biol.* 10:310-316.
- Krishna, P. and Gloor, G. 2001. The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress Chaperones* 6:238-246.

- Lambert, W., Koeck, P. J. B., Ahrman, E., Purhonen, P., Cheng, K., Elmlund, D., Hebert, H., and Emanuelsson, C. 2011. Subunit arrangement in the dodecameric chloroplast small heat shock protein Hsp21. *Protein Sci.* 20:291-301.
- Lee, G. J. and Vierling, E. 2000. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol.* 122:189-198.
- Lee, S., Sowa, M. E., Watanabe, Y. H., Sigler, P. B., Chiu, W., Yoshida, M., and Tsai, F. T. 2003. The structure of ClpB: a molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell* 115:229-240.
- Leidholda, C and Voos, W. 2007. Chaperones and proteases guardians of protein integrity in eukaryotic organelles. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1113:72-86.
- Li, G. L., Chang, H., Li, B., Zhou, W., Sun, D. Y., and Zhou, R. G. 2007. The roles of the atDjA2 and atDjA3 molecular chaperone proteins in improving thermotolerance of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Sci.* 173:408-416.
- Li, J., Qian, X., and Sha, B. 2003. The crystal structure of the yeast Hsp40 Ydj1 complexed with its peptide substrate. *Structure* 11:1475-1483.
- Liu, N. Y., Ko, S. S., Yeh, K. C., and Charng, Y. Y. 2006. Isolation and characterization of tomato Hsa32 encoding a novel heat-shock protein. *Plant Sci.* 170:976-985.
- Liu, Q., Zhao, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Shinozaki, K. 2000. Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. *Chinese Sci. Bull.* 45:970-975.
- Lu, Z. and Cyr, D. M. 1998. The conserved carboxyl terminus and zinc finger-like domain of the co-chaperone Ydj1 assist Hsp70 in protein folding. *J. Biol. Chem.* 273:5970-5978.
- Mahmood, T., Safdar, W., Abbasi, B. H., and Naqvi, S. M. S. 2010. An overview on the small heat shock proteins. *Afr. J. Biotechnol.* 9:927-949.
- Mayer, M. P., and Bukau, B. 2005. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* 62:670-684.

- Meinke, D. W., Cherry, J. M., Dean, C., Rounsley, D. S., and Koornneef, M. 1998. Analysis *Arabidopsis thaliana*: a model plant for genome. *Science* 282:662-682.
- Miernyk, J. A. 2001. The J-domain proteins of *Arabidopsis thaliana*: an unexpectedly large and diverse family of chaperones. *Cell Stress Chaperones*. 6:209-218.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M., and Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9:490-498.
- Morrow, G. and Tanguay, R. M. 2012. Small heat shock protein expression and functions during development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44:1613-1621.
- Mymrikov, E. V., Seit-Nebi, A. S., and Gusev, N. B. 2011. Large potentials of small heat shock proteins. *Physiol. Rev.* 91:1123-1159.
- Nakamoto, H. and Vigh, L. 2007. The small heat shock proteins and their clients. *Cell. Mol. Life Sci.* 64:294-306.
- Narberhaus, F. 2002. α -Crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66:64-93.
- Nobel, P. S. 2003. *Environmental Biology of Agaves and Cacti*. Cambridge University Press, New York. 284 pp.
- Nollen, E. A. and Morimoto, R. I. 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing heat shock proteins. *J. Cell Sci.* 115:2809-2816.
- Noven, L. G., Haskell, D. W., Guy, C. L., Denslow, N., Klein, P. A. Green, L. G., and Silverman, A. 1992. Association of 70-kilodalton heat-shock cognate proteins with acclimation to cold. *Plant Physiol.* 99:1362-1369.
- Ochoa-Alfaro, A. E., Rodríguez-Kessler, M., Pérez-Morales, M. B., Delgado-Sánchez, P., Cuevas-Velazquez, C. L., Gómez-Anduro, G., and Jiménez-Bremont, J. F. 2012. Functional characterization of an acidic SK3 dehydrin isolated from an *Opuntia streptacantha* cDNA library. *Planta.* 235:565-557.
- Parcy, F., Valon, C., Raynal, M., Gaubier-Comella, P., Delseny, M., and Giraudat, J. 1995. Regulation of gene expression programs during *Arabidopsis* seed

- development: roles of the ABI3 locus and of endogenous abscisic acid. *Plant Cell*. 6:1567-1582.
- Pearl, L. H. and Prodromou, C. 2006. Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery, *Annu. Rev. Biochem.* 75:271-294.
- Peng, J., Huang, C. H., Short, M. K., and Jubinsky, P. T. 2005. Magmas gene structure and evolution. *In Silico Biol.* 5:251-263.
- Pimienta, E. 1990. El nopal tunero. Serie Libros Tiempos de Ciencia. Guadalajara: Editorial Universidad de Guadalajara. 246 pp.
- Pimienta-Barrios, E. 1994. Prickly pear (*Opuntia* spp.): A valuable fruit crop for the semi-arid lands of Mexico. *J. Arid Environ.* 28:1-11.
- Pimienta-Barrios, E. A., González del Castillo-Aranda, M. E., Muñoz-Urias, M. E., and Nobel, P. S. 2003. Effects of benomyl and drought on the mycorrhizal development and daily net CO₂ uptake of a wild platyopuntia in a rocky semiarid environment. *Ann. Bot.* 92: 1-7.
- Promega. 2009. Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System. Catalog No. A9281. 34 pp.
- Promega, 2008. Quiagen HotStarTaq[®] PCR Handbook. Catalog No. 202602. 1-44 pp.
- Qiu, X. B., Shao, Y. M., Miao, S., and Wang, L. 2006. The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol. Life Sci.* 63:2560-2570.
- Rajan, V. B. V. and D'Silva, P. 2009. *Arabidopsis thaliana* J-class heat shock proteins: cellular stress sensors. *Funct Integr Genomics.* 9:433-446.
- Rao, K. V. M. 2006. Introduction. In: *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerance in Plants*. K. V. Madhava Rao, A. S. Raghavendra and K. Janardhan Reddy. (Eds.), Springer. The Netherlands. Chap. 1, pp 1-14.
- Recchia, G. H., Caldas, D. G. G., Beraldo, A. L. A., da Silva, M. J., and Tsai, S. M. 2013. Transcriptional analysis of drought-induced genes in the roots of a tolerant genotype of the common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Int. J. Mol. Sci.* 14:7155-7179.
- Reyes-Agüero, J. A., Aguirre, J. R., and Valiente-Banuet, A. 2006. Reproductive biology of *Opuntia*: A review. *J. Arid Environ.* 64:549-585.

- Rojas, A., Almoguera, C., and Jordano, J. 1999. Transcriptional activation of a heat shock gene promoter in sunflower embryos: synergism between ABI3 and heat shock factors. *Plant J.* 20:601-610.
- Rossel, J. B., Wilson, I. W., and Pogson, B. J. 2002. Global changes in gene expression in response to high light in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130:1109-1120.
- Sáenz, C., Berger, H., Corrales, J., Galletti, L., García, V., Higuera, I., Mondragon, C., Rodríguez-Félix, A., Sepúlveda, E. y Varnero, M. 2006. Utilización agroindustrial del nopal. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO, No. 162, pp: 165. Servicio de Tecnologías de Ingeniería Agrícola y Alimentaria (AGST), Red Internacional de Cooperación Técnica del Nopal (FAO-CACTUSNET).
- SAGAR (Secretariat of Agriculture) 2000. Actual situation and perspective of bean production in Mexico: 1990-2000, CEA-SAGAR.
- Sairam, R. K. and Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci.* 86:407-421.
- Sarkar, N. K., Kim, Y. K., and Grover, A. 2009. Rice sHsp genes: genomic organization and expression profiling under stress and development. *BMC Genomics.* 10:393; 1-18.
- Scharf, K. D., Berberich, T., Ebersberger, I., and Nover, L. 2012. The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: Structure, function and evolution. *BBA- Gene Regul. Mechanis.* 1819:104-119.
- Scharf, K. D.; Siddique, M., and Vierling, E. 2001. The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing α -crystallin domains (Acd proteins). *Cell Stress Chaperones.* 6:225-237.
- Schöffl, F., Prändl, R., and Reindl, A. 1998. Regulation of heat-shock response. *Plant Physiol.* 117:1135-1141.
- Shen, L. and Yu, H. 2011. J3 regulation of flowering time is mainly contributed by its activity in leaves. *Plant Signal. Behav.* 6:601-603.

- Shen, L., Kang, Y. G. G., Liu, L., and Yu, H. 2011. The J-Domain protein J3 mediates the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 23:499-514.
- Shi, Y. Y., Hong, X. G., and Wang, C. C. 2005. The C-terminal (331–376) sequence of *Escherichia coli* DnaJ is essential for dimerization and chaperone activity: a small angle X-ray scattering study in solution. *J. Biol. Chem.* 280:22761-22768.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3:217-223.
- ShuiFeng, Y. E., ShunWu, Y. U., LieBo, S. H. U., JinHong, W. U., AiZhong, W. U. and LiJun, L. U. O. 2012. Expression profile analysis of 9 heat shock protein genes throughout the life cycle and under abiotic stress in rice. *Mol. Biol.* 57:336-343.
- Siddique, M., Port, M., Tripp, J., Weber, C., Zielinski, D., Calligaris, R., Winkelhaus, S., and Scharf, K-D. 2008. Tomato heat stress protein Hsp16.1-CIII represents a member of a new class of nucleocytoplasmic small heat stress proteins in plants. *Cell Stress Chaperones* 8:381-394.
- Smirnoff, N. 1998. Plant resistance to environmental stress. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:214-219.
- Stone, P. 2001. The effects of heat stress on cereal yield and quality. In: A.S. Basra (Ed.) *Crop Responses and Adaptations to Temperature Stress*, Food Products Press, Binghamton, NY. 243-291 pp.
- Sugimoto, S., Nakayama, J., Fukuda, D., Sonezaki, S., Watanabe, M., Towskhong, A., and Sonomoto, K. 2003. Effect of heterologous expression of molecular chaperone DnaK from *Tetragenococcus halophilus* on salinity adaptation of *Escherichia coli*. *J. Biosci. Bioeng.* 96:129-133.
- Sun, W., Bernard, C., van de Cotte, B., Montagu, M., Montagu, M. V., and Verbruggen, N. 2001. At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. *Plant J.* 27:407-415.

- Sun, W., Montagu, M.V. and Verbruggen, N. 2002. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *BBA-Gene Struct. Express.* 1577:1-9.
- Sun, Y. and MacRae, T. H. 2005. Small heat shock proteins: Molecular structure and chaperone function. *Cell Mol. Life Sci.* 62:2460-2476.
- Sung, D. Y., Kaplan, F., Lee, K. J., and Guy, C. L. 2003. Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends Plant Sci.* 8:179-187.
- Swindell, W. R., Huebner, M., and 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. *BMC Genomics.* 8:125
- Szabo, A., Korszun, R., Hartl, F. U., and Flanagan, J. 1996. A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J.* 15:408-417.
- Temsamani, K. R., Bouchta, D., Fahmi, T., Benicha, M., Bennouna, M., and Azmani, A. 1995. Evaluation of the photosynthesis inhibitory effect of new sulfonylureas derivatives on *Oxalis pescaprae*. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 38:63-66.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature.* 408:796-815.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science.* 282:2012-2046.
- Thomashow, M. F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50:571-599.
- Tkach, J. M. and Glover, J. R. 2004. Amino acid substitutions in the Cterminal AAA+ module of Hsp104 prevent substrate recognition by disrupting oligomerization and cause high temperature inactivation. *J. Biol. Chem.* 279:35692-35701.

- Tsai, J. and Douglas, M. G. 1996. A conserved HPD sequence of the Jdomain is necessary for YDJ1 stimulation of Hsp70 ATPase activity at a site distinct from substrate binding. *J. Biol. Chem.* 271:9347-9354.
- van Montfort, R. L. M., Basha, E., Friedrich, K. L., Slingsby, C. and Vierling, E. 2001b. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat. Struct. Biol.* 8:1025-1030.
- van Montfort, R., Slingsby, C. and Vierling, E. 2001a. Structure and function of the small heat shock protein/alpha-crystallin family of molecular chaperones. *Adv. Protein Chem.* 59:105-156.
- Vierling, E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42:579-620.
- Vierling, E., Jaya, N., and Garcia, V. 2009. Substrate binding site flexibility of the small heat shock protein molecular chaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106:15604-15609.
- Wahid, A. and Close, T. J. 2007. Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biol. Plant.* 51:104-109.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., and Foolad, M. R. 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environ. Exp. Bot.* 61:199-223.
- Walsh, P., Bursac, D., Law, Y. C., Cyr, D., and Lithgow, T. 2004. The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO J.* 5:567-571.
- Wang, W. X., Vinocur, B., Shoseyov, O., and Altman, A. 2001. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Hort.* 560:285-292.
- Wang, W., Vinocur, B., and 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., and Altman, A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9:244-252.

- Wang, Z. Q., Yuan, Y. Z., Ou, J. Q., Lin, Q. H., and Zhang, C. F. 2007. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. *J. Plant Physiol.* 164:695-701.
- Waters, E. R. 2013. The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs. *J. Exp. Bot.* 64:391-403.
- Waters, E. R., Aebermann, B. D., and Sanders-Reed, Z. 2008. Comparative analysis of the small heat shock proteins in three angiosperm genomes identifies new subfamilies and reveals diverse evolutionary patterns. *Cell Stress Chaperones.* 13:127-142.
- Waters, E. R., Lee, G. J., and Vierling, E. 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* 47: 325-338.
- Wehmeyer, N. and Vierling, E. 2000. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol.* 122: 1099-1108.
- Wehmeyer, N., Hernandez, L. D., Finkelstein, R. R., and Vierling, E. 1996. Synthesis of small heat-shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiol.* 112: 747-757.
- Wickner, S., Maurizi, M. R., and Gottesman, S. 1999. Posttranslational quality control: folding, refolding, and degrading proteins. *Science.* 286: 1888-1893.
- Winter, K., Aranda, J., and Holtum, J. A. M. 2005. Carbon isotope composition and water-use efficiency in plants with crassulacean acid metabolism. *Funct. Plant Biol.* 32: 381-388.
- Xue, Y., Peng, R., Xiong, A., Li, X., Zha, D., and Yao, Q. 2010. Over-expression of heat shock protein gene hsp26 in *Arabidopsis thaliana* enhances heat tolerance. *Biol. Plant.* 54:105-111.
- Yamamoto, M., Maruyama, D., Endo, T., and Nishikawa, S. 2008. *Arabidopsis thaliana* has a set of J proteins in the endoplasmic reticulum that are conserved from yeast to animals and plants. *Plant Cell Physiol.* 49:1547-1562.

- Yan, W. and Craig, E. A. 1999. The glycine-phenylalanine-rich region determines the specificity of the yeast Hsp40 Sis1. *Mol. Cell. Biol.* 19:7751-7758.
- Yang, Y., Qin, Y., Xie, C., Zhao, F., Zhao, J., Liu, D., Chen, S., Fuglsang, A. T., Palmgren, M. G., Schumaker, K. S., Deng, X. W., and Guob, Y. 2010. The *Arabidopsis* chaperone J3 regulates the plasma membrane H⁺-ATPase through interaction with the PKS5 Kinase. *Plant Cell.* 22:1313-1332.
- Yeh, K. W., Jinn, T. L., Yeh, C. H., Chen, Y. M., and Lin, C. Y. 1994. Plant low-molecular-mass heat-shock proteins: their relationship to the acquisition of thermotolerance in plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 19:41-49.
- Young, J. C., Barral, J. M., and Ulrich, Hartl F. 2003. More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends Biochem. Sci.* 28:541-547.
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W., and Chua, N. H. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat. Prot.* 1:641-646.
- Zhao, Y., Wang, T., Zhang, W. and Li, X. 2011. SOS3 mediates lateral root development under low salt stress through regulation of auxin redistribution and maxima in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 189:1122-1134.
- Zhichang, Z., Wanrong, Z., Jinping, Y., Jianjun, Z., Xufeng, L. Z. L., and Yang, Y. 2010. Over-expression of *Arabidopsis* DnaJ (Hsp40) contributes to NaCl-stress tolerance. *Afr. J. Biotechnol.* 9:972-978.
- Zhou, R., Kroczyńska, B., and Miernyk, J. A. 1999. AtJ3 (accession no. U22340), an *Arabidopsis* J-protein homologous to *Saccharomyces cerevisiae* YDJ1p. *Plant Physiol.* 121:1053-1055.
- Zhou, Y., Chen, H., Chu, P., Li, Y., Tan, B., Ding, Y., Tsang, E. W. T., Jiang, L., Wu, K., and Huang, S. 2012. NnHSP17.5, a cytosolic class II small heat shock protein gene from *Nelumbo nucifera*, contributes to seed germination vigor and seedling thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* 31:379-389.
- Zhu J. K. Bressan, R. A., and Hasegawa, P. M. 1993b. Isoprenylation of the plant molecular chaperone ANJI facilitates membrane association and function at high temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:8557-8561.

- Zhu, J. K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6:66-71.
- Zhu, J. K., Shi, J., Bressan, R. A., and Hasegawa, P. M. 1993a. Expression of an *Atriplex nummularia* gene encoding a protein homologous to the bacterial molecular chaperone DnaJ. *Plant Cell.* 5:341-349.
- Zietkiewicz, S., Krzewska, J., and Liberek, K. 2004. Successive and synergistic action of the Hsp70 and Hsp100 chaperones in protein disaggregation. *J. Biol. Chem.* 279:44376-44383.
- Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W. 2004. GENEVESTIGATOR *Arabidopsis* Microarray Database and Analysis Toolbox. *Plant Physiol.* 136:2621-2632.
- Zoua, J., Liub, A., Chena, X., Zhoua, X., Gao, G., Wang, W., and Zhang, X. 2009. Expression analysis of nine rice heat shock protein genes under abiotic stresses and ABA treatment. *J. Plant Physiol.* 166:851-861.
- zur Nieden, U., Neumann, D., Bucka, A., and Nover, L. 1995. Tissue-specific localization of heat-stress proteins during embryo development. *Planta.* 196:530-538.
- Zybailov, B., Rutschow, H., Friso, G., Rudella, A., Emanuelsson, O., Sun, Q., and van Wijk, K. J. 2008. Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *Plos One.* 3:1-19.