



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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

**AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE GENES DE  
*Opuntia streptacantha* INDUCIDOS EN  
CONDICIONES DE ESTRÉS ABIÓTICO**

Tesis que presenta

**Claudia Olivia Silva Ortega**

Para obtener el grado de

**Doctora en Ciencias en Biología Molecular**

Director de la Tesis

**Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**

San Luís Potosí, S.L.P., Diciembre de 2008



## Constancia de aprobación de la tesis

La tesis "**Aislamiento e Identificación de genes de *Opuntia streptacantha* inducidos en condiciones de estrés abiótico**" presentada para obtener el Grado de Doctora en Ciencias en Biología Molecular, fue elaborada por **Claudia Olivia Silva Ortega** y aprobada el **10 de diciembre de 2008** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

---

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

---

Dr. Gerardo Amando Aguado Santacruz  
(Co-Director de la tesis)

---

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

---

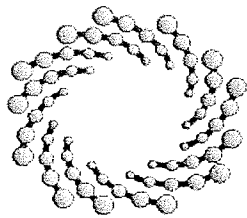
Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís  
(Asesor de la tesis)



## **Créditos Institucionales**

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de Hongos y Plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C., bajo la co-dirección del Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont y el Dr. Gerardo Armando Aguado Santacruz.

Durante la realización del trabajo la autora recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (176116) y de la Agencia Española de Cooperación Internacional.



**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 019 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Doctorado en Ciencias en Biología Molecular está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 17 días del mes de diciembre del año 2008, se reunió a las 12:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

<b>Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler</b>	<b>Presidente</b>	<b>UNAM</b>
<b>Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont</b>	<b>Secretario</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís</b>	<b>Sinodal</b>	<b>IPICYT</b>
<b>Dr. Gerardo Armando Aguado Santacruz</b>	<b>Sinodal externo</b>	<b>INIFAP</b>

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

**DOCTORA EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA MOLECULAR**

sustentó la C.

**Claudia Olivia Silva Ortega**

sobre la Tesis intitulada:

*Aislamiento e Identificación de Genes de Opuntia streptacantha Inducidos en Condiciones de Estrés Abiótico*

que se desarrolló bajo la dirección de

**Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**  
**Dr. Gerardo Armando Aguado Santacruz (INIFAP)**

El Jurado, después de deliberar, determinó

**APROBARLA**

Dándose por terminado el acto a las 14:57 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé 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 17 días del mes de diciembre de 2008.

  
**Dr. Marcial Bonilla Marín**  
Secretario Académico



  
**Mtra. Ivonne Lizette Quévas Vélez**  
Jefa del Departamento de Asuntos Escolares

A mis papás

A Juan Antonio, Yazmín y Yovana

A Pablo

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont por todas sus enseñanzas durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Armando Aguado Santacruz, Dr. Ángel Gabriel Alpuche Solís y Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler por haber aceptado ser parte de mi jurado y por sus aportaciones para mejorar este trabajo.

Al Dr. Julio Salinas Muñoz por brindarme la oportunidad de integrarme en su grupo de investigación.

Al Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch por la donación de los cultivos vegetales *in vitro* de *Opuntia* spp.

A la M.C. Alicia Becerra Flora por el apoyo técnico brindado para la realización de esta tesis.

A mis compañeros de laboratorio del IPICYT y del CIB.

# ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	4
2.1 Estrés abiótico.....	4
2.1.1 Sequía.....	5
2.1.2 Salinidad.....	6
2.1.3 Temperaturas extremas.....	7
2.2 Respuesta de las plantas al estrés abiótico.....	8
2.2.1 Efecto del estrés por sequía.....	9
2.2.1.1 Percepción de la sequía y transducción de la señal...10	
2.2.1.2 Estrés oxidativo.....	11
2.2.1.3 Estrés osmótico.....	12
2.2.1.4 Proteínas y metabolitos en respuesta a la sequía.....	14
2.2.1.4.1 Proteínas LEA.....	14
2.2.1.4.2 Acuaporinas.....	15
2.2.1.4.3 Poliaminas.....	16
2.2.2 Efecto del estrés salino.....	17

2.2.2.1 Estrés iónico.....	18
2.2.3 Efecto del estrés por calor.....	19
2.2.3.1 Percepción del calor y transducción de la señal.....	21
2.2.3.2 Proteínas de choque térmico.....	23
2.3 El nopal: modelo de estudio.....	23
2.3.1 Usos del nopal.....	24
2.3.2 Características morfológicas y fisiológicas del nopal.....	25
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>28</b>
3.1 Objetivo general.....	28
3.2 Objetivos específicos.....	28
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
4.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento.....	30
4.1.1 Cultivo <i>in vitro</i> .....	30
4.1.2 Germinación de semillas.....	31
4.2 Medios de cultivo para plantas.....	31
4.2.1 Medio de Murashige y Skoog.....	31
4.2.2 Medio de Hoagland.....	32
4.3 Tratamientos de estrés o ácido abscísico.....	33
4.3.1 Estrés por sequía y calor.....	33
4.3.2 Estrés salino.....	34
4.3.3 Tratamiento con ácido abscísico.....	34
4.4 Análisis morfológicos.....	34
4.5 Análisis bioquímicos.....	35
4.5.1 Determinación de prolina.....	35



4.5.2	Determinación de clorofila.....	35
4.5.3	Determinación de actividad enzimática de la P5CS.....	35
4.5.4	Cuantificación de proteínas.....	36
4.6	Análisis de Biología Molecular.....	37
4.6.1	Técnicas de aislamiento de ácidos nucleicos.....	37
4.6.1.1	Extracción de ADN de <i>Opuntia streptacantha</i> .....	37
4.6.1.2	Extracción de ARN total de <i>Opuntia streptacantha</i> ...	37
4.6.1.3	Extracción de ADN plasmídico.....	37
4.6.2	Técnicas de amplificación y aislamiento de genes específicos de <i>Opuntia streptacantha</i> .....	37
4.6.2.1	Síntesis de ADN complementario (cADN).....	37
4.6.2.2	Clonación de los fragmentos <i>Osactina-1</i> , <i>Osp5cs</i> y <i>Osef-1</i> de <i>Opuntia streptacantha</i> .....	38
4.6.2.3	Clonación de los fragmentos <i>Ostpdpk<math>\alpha</math>0</i> , <i>Ostpdpk<math>\alpha</math>1</i> y <i>Ostpdpk<math>\alpha</math>2</i> de <i>Opuntia streptacantha</i> .....	40
4.6.2.4	Clonación de los cDNAs <i>Ostsui1 A</i> y <i>Ostsui1 B</i> de <i>Opuntia streptacantha</i> .....	41
4.6.3	Genoteca sustractiva.....	41
4.6.4	Plásmidos.....	42
4.6.5	Transformación de <i>Escherichia coli</i> .....	42
4.6.6	Secuenciación de ADN.....	42
4.6.7	Análisis de RT-PCR de los genes obtenidos en la genoteca sustractiva.....	43

4.7 Análisis bioinformáticos.....	45
<b>5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>47</b>
5.1 Identificación de genes inducidos en estrés hídrico y calor en nopal.....	47
5.2 El estrés salino incrementa la expresión del gen <i>p5cs</i> e induce la acumulación de prolina en nopal.....	112
5.3 Análisis de la pérdida de función de genes ortólogos de <i>Arabidopsis thaliana</i> aislados en la genoteca sustractiva de nopal en condiciones de estrés por sequía y calor.....	124
<b>6. CONCLUSIONES.....</b>	<b>155</b>
<b>7. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>157</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>158</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración de benciladenina empleada en cultivo <i>in vitro</i> .....	31
Tabla 2. Medio de Murashige y Skoog.....	32
Tabla 3. Solución de Hoagland 1X.....	33
Tabla 4. Oligonucleótidos diseñados para el aislamiento de genes de nopal.....	39
Tabla 5. Oligonucleótidos diseñados para análisis de RT-PCR.....	44
Tabla 6. Solución para esterilizar semillas de <i>A. thaliana</i> .....	130
Tabla 7. Medio de Murashige y Skoog para <i>A. thaliana</i> .....	130
Tabla 8. Buffer de homogenización.....	131
Tabla 9. Oligonucleótidos diseñados para determinar homocigosis.....	132
Tabla 10. Solución Z6.....	133
Tabla 11. Genes para ser analizados en <i>A. thaliana</i> .....	136

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Precipitación total anual en México.....	6
Fig. 2 Respuesta y adaptación de las plantas al estrés abiótico.....	9
Fig. 3 Estructura química de la L-prolina.....	13
Fig. 4 Biosíntesis de prolina en plantas.....	14
Fig. 5 <i>Opuntia</i> spp.....	24
Fig. 6 Metabolismo ácido de las crasuláceas en <i>Opuntia</i> .....	26
Fig. 7 Representación del locus At3g12830 (auxin-responsive family protein)...	145
Fig. 8 Análisis del promotor y localización de la inserción del T-DNA en el gen At3g12830 (auxin-responsive family protein) en la línea cs857312.....	146
Fig. 9 Análisis de la expresión del locus At3g12830 en presencia de <i>Pseudomonas syringae</i> y elicitores.....	147
Fig. 10 Representación del locus At1g16180 (tumour differentially expressed (TDE) family protein / TMS membrane family protein).....	148
Fig. 11 Alineamiento de aminoácidos derivado de la identidad de los genes At1g16180 y At3g06170 de <i>A. thaliana</i> .....	149

## RESUMEN

Las temperaturas extremas junto con la sequía y la salinidad, constituyen los factores ambientales que más negativamente afectan el desarrollo de las plantas. El nopal (*Opuntia* spp.) ha desarrollado adaptaciones particulares que le permiten enfrentar las adversas condiciones climáticas de las zonas áridas y semiáridas y representa uno de los recursos de mayor potencial en el aprovechamiento de estas regiones en diversos países.

El objetivo principal de la tesis fue aislar y caracterizar genes de nopal inducidos en condiciones de estrés hídrico y calor. Mediante una hibridación sustractiva (SSH) se obtuvieron 122 uni-genes potencialmente inducidos en cladodios de *Opuntia streptacantha* en estrés hídrico y a 40° C a los 13 días de tratamiento. El análisis de BLASTX mostró que aproximadamente el 78% de los uni-genes obtenidos presenta homología con genes de otras plantas, de los cuales el 9% han sido identificados en condiciones de estrés y el 18% son de función desconocida. Además los uni-genes obtenidos, para los cuales su función ha sido descrita, participan en diversos procesos metabólicos. Mediante análisis de RT-PCR semi-cuantitativa confirmamos que 26 uni-genes son sobre-expresados en nopal en estrés hídrico y a 40° C a los 13 días, condiciones en las que se realizó la hibridación sustractiva. Adicionalmente aislamos una variante de procesamiento alternativo (retención de intrón) del uni-gen 27 que codifica para la subunidad alfa de la fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato (*Ostpdpk $\alpha$ 1*), expresado únicamente en condiciones de estrés hídrico y calor. Por otro lado obtuvimos la secuencia completa del cDNA de dos isoformas del factor de iniciación de la traducción (*Ostsui1*; uni-gen 13) mediante PCR inverso de una genoteca de cDNA

completa de nopal, utilizando la información del EST de *sui1*. Además demostramos que el gen *sui1* es diferencialmente expresado en diversas condiciones de estrés abiótico.

Para continuar con la caracterización de los uni-genes obtenidos en la SSH de nopal, caracterizamos la expresión del uni-gen 65 que codifica para la delta 1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa (*Osp5cs*) involucrada en la biosíntesis de prolina; osmolito compatible que se acumula en condiciones de estrés. La secuencia obtenida de este gen presenta una identidad del 90.4% con un homólogo de *Mesembryanthemum crystallinum*. Nuestros resultados muestran que el gen *Osp5cs* se sobre-expresa a los 9 y 11 días de tratamiento salino, además de ser inducido por la aplicación exógena de ácido abscísico. También examinamos en cladodios de nopal sometidos a estrés salino durante 11 días el contenido de prolina. Nuestros resultados muestran un aumento gradual en los niveles de prolina de forma dependiente de los días de tratamiento y concentración de NaCl. Finalmente, con la intención de estudiar la pérdida de función bajo estrés abiótico de algunos de los uni-genes obtenidos en la genoteca sustractiva de nopal, analizamos once genes ortólogos utilizando como herramienta líneas mutantes insercionales de *Arabidopsis thaliana*. Identificamos y caracterizamos plantas homocigotas insercionales correspondientes a los genes At3g12830 (auxin-responsive family protein; línea cs857312) y At1g16180 (tumour differentially expressed (TDE) family protein / TMS membrane family protein; línea salk\_084244). En la línea cs857312 la interrupción del gen At3g12830 por el T-DNA causó su sobre-expresión. El fenotipo en condiciones de estrés abiótico de esta línea no mostró diferencias con respecto a la línea "wild type" de *Arabidopsis*

*thaliana*. Por otro lado, la línea salk\_084244 “knockout” de *Arabidopsis thaliana* del gen At1g16180 no presentó un fenotipo particular en condiciones de estrés abiótico.

Con este trabajo logramos una pequeña pero importante plataforma de genes que potencialmente están inducidos en estrés hídrico y calor en nopal, y además la caracterización de dos uni-genes aislados en dicha genoteca. Además sentamos la base para análisis posteriores, por ejemplo la búsqueda de una correlación entre la sobre-expresión de los genes que participan en el proceso de fotosíntesis, mostrada en este trabajo, y el estado a nivel bioquímico y funcional del aparato fotosintético en condiciones de estrés; la caracterización de los genes de respuesta a estrés y el análisis de los genes de función desconocida, entre otros.

Palabras clave: ESTs; estrés abiótico; genes inducidos; líneas insercionales de *Arabidopsis thaliana*; *Opuntia streptacantha*; prolina; SSH.

## ABSTRACT

Extreme temperatures, in conjunction with drought and salinity, constitute the major abiotic stresses affecting plant growth and development. *Opuntia* spp. has developed particular adaptations that allow to confront the adverse climatic conditions of the arid and semiarid zones and represents one of the resources of major potential in the development of these regions in diverse countries.

The principal aim of this thesis was to isolate and to characterize genes of cactus pear induced in water and heat stress. By means of a subtractive hybridization we obtained 122 uni-genes potentially induced in *Opuntia streptacantha* young plants grown for 13 days under restricted water supply and high temperature (40° C). BLASTX analysis showed that approximately 78% of the uni-genes present homology with genes of other plants, of which 9% has been identified in stress conditions and 18% are of unknown function. Moreover the uni-genes for which its function has been described are involved in various metabolic processes. By RT-PCR analyses we confirmed that 26 uni-genes are differentially expressed in *Opuntia streptacantha* under water and heat stress. Additionally we isolate a splicing variant (an intron retention) of the 27 uni-gene that codifies for the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit (*Ostpdpk $\alpha$ 1*) induced only in response to water and heat stress. On the other hand we obtained the full length cDNA sequence of two isoforms of the translation initiation factor (*sui1*; uni-gene 13) through a reverse PCR from a cDNA library of cactus pear, using the information from *sui1* EST. In addition we demonstrated that *sui1* is differentially expressed in various conditions of abiotic stress.



To continue with the characterisation of the obtained uni-genes in the SSH of cactus pear, we analyse the expression of 65 uni-gene that codifies for the delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (*Osp5cs*) involved in proline biosynthesis; compatible osmolyte that accumulates under stress conditions. The amino acid sequence obtained exhibit 90.4% of identity with the P5CS protein from *Mesembryanthemum crystallinum*. Our results show that *Osp5cs* is induced by salt stress at 9 and 11 days of treatment, besides being induced by the exogenous application of abscisic acid. We also examined the proline content in cactus pear cladodes under salt stress during 11 days. Our results show an increased in the proline levels in a time- and concentration-dependent manner.

Finally, with the intention of study the loss of function under abiotic stress, we analyses eleven ortholog genes using as a tool T-DNA insertion mutants of *Arabidopsis thaliana*. We identified and characterised homozygous insertional plants corresponding to At3g12830 (auxin-responsive family protein; line cs857312) and At1g16180 (tumour differentially expressed (TDE) family protein / TMS membrane family protein; line salk\_084244) genes. In the cs857312 line the interruption of At3g12830 gene by the T-DNA caused its over-expression. The phenotype of this line in abiotic stress conditions did not show differences with respect to the wild type line of *Arabidopsis thaliana*. On the other hand, the knockout line salk\_084244 of *Arabidopsis thaliana* corresponding to At1g16180 did not show a particular phenotype in abiotic stress conditions.

Whit this work we present the first genes of cactus pear expressed in stress and as a consequence the first analysis of the molecular mechanisms in response to abiotic stress in this cactacea. In addition the basis for further analyses, for

example, the search for a correlation between the over-expression of the genes involved in the photosynthesis process, shown in this work, and the state at biochemical and functional level of the photosynthetic apparatus in stress conditions; the characterisation of the stress response genes and the analysis of the unknown function genes, among others.

Key words: abiotic stress; *Arabidopsis thaliana* insertional lines; ESTs; induced genes; *Opuntia streptacantha*; proline; SSH.

## 1. INTRODUCCIÓN

En fisiología vegetal el término “estrés” es definido como cualquier condición potencialmente desfavorable que afecta el metabolismo y bloquea el crecimiento y desarrollo de las plantas (Lichtenthaler, 1996). Los efectos del estrés pueden ser parcialmente compensados por la aclimatación o adaptación de las plantas, sin embargo cuando el estrés es fuerte o crónico causa un daño considerable que eventualmente lleva a la muerte de la planta. El estrés puede ser inducido por factores naturales o antropogénicos, y ha sido clasificado como estrés biótico o abiótico. El estrés abiótico es uno de los factores que más limita el crecimiento y la producción agrícola a nivel mundial (Boyer, 1982; Rosegrant y Cline, 2003). La sequía, las temperaturas extremas y los suelos salinos son el estrés abiótico más común a los cuales las plantas están expuestas. Las regiones áridas cubren cerca del 41% de la superficie de la tierra y son el hogar para más del 38% de la población mundial actual (Reynolds y col., 2007). La degradación más severa está presente en 10 a 20% de éstas tierras y como consecuencia se estima que la desertificación afecta directamente a más de 250 millones de personas en el mundo (Reynolds y col., 2007). Por otro lado se ha estimado que el 20% de la tierra cultivada y cerca del 50% de la tierra irrigada en el mundo es afectada por la acumulación de sales (Zhu, 2001). El estrés abiótico como la sequía, salinidad y las temperaturas extremas afectan el crecimiento y desarrollo de cultivos económicamente importantes. Por todo lo anterior es necesario conocer los mecanismos moleculares por los que las plantas se adaptan y toleran el estrés, mediante el uso de herramientas de biología molecular que nos permitirán identificar los genes involucrados en la tolerancia.

Como consecuencia del estrés las plantas presentan cambios en el balance de carbono, descenso en la asimilación de nutrientes, reducción en la tasa fotosintética y reducción en el crecimiento (Chapin y col., 1988). Los mecanismos de tolerancia de las plantas al estrés son multifactoriales e incluyen la expresión de varios grupos de genes; la acumulación de solutos compatibles involucrados en la protección de estructuras celulares y el ajuste osmótico, mediado a través de compuestos tales como la prolina; y el mantenimiento del equilibrio iónico en el caso del estrés salino (Bartels y Sunkar, 2005).

Diversas plantas han sido utilizadas como modelo para esclarecer los mecanismos de tolerancia a diversos tipos de estrés abiótico. Por ejemplo, *Retama raetam* (Mittler y col., 2001) y *Craterostigma plantagenium* (Bartels y Salamini, 2001) a la sequía, *Mesembryanthemum crystallinum* y *Thellungiella halophila* al estrés salino (Bohnert y Cushman, 2000), algunas genotipos o especies de pastos como *Festuca* spp (Zhang y col., 2005; Xu y col., 2007) tolerantes a estrés por calor y finalmente el trigo (*Triticum aestivum*) tolerante a frío (Omid y col., 2006).

Debido a que el nopal (*Opuntia* spp) es una cactácea originaria de México que se caracteriza por ser una planta tolerante a la sequía y a las temperaturas extremas, la hemos seleccionado como modelo de estudio para conocer los mecanismos moleculares de tolerancia a estos factores abióticos. Además de que el nopal muestra características fisiológicas y morfológicas que le han permitido adaptarse a condiciones de sequía y temperaturas extremas, la respuesta a estas condiciones, quizá involucra la acción de diferentes mecanismos de percepción y señalización; dichos mecanismos llevaran al final a la expresión diferencial de

genes, que finalmente le permitirán a esta planta realizar los cambios necesarios para resistir el estrés.

## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Estrés abiótico**

El cambio climático es una de las amenazas ambientales, sociales y económicas más grandes que hace frente el planeta. Las actividades humanas contribuyen de manera importante al cambio climático; por ejemplo, el uso de combustible fósil incrementa la concentración global de dióxido de carbono, la agricultura produce un incremento en las concentraciones de metano y óxido nitroso (IPCC, 2007) y la deforestación afecta el clima debido a que libera el carbón almacenado en las plantas y el suelo, y altera las propiedades físicas de la superficie del planeta (Bala y col., 2007). El aumento en las emisiones de gases invernadero ha disparado eventos climáticos extremos como inundaciones, sequías y ondas de calor (IPCC, 2007).

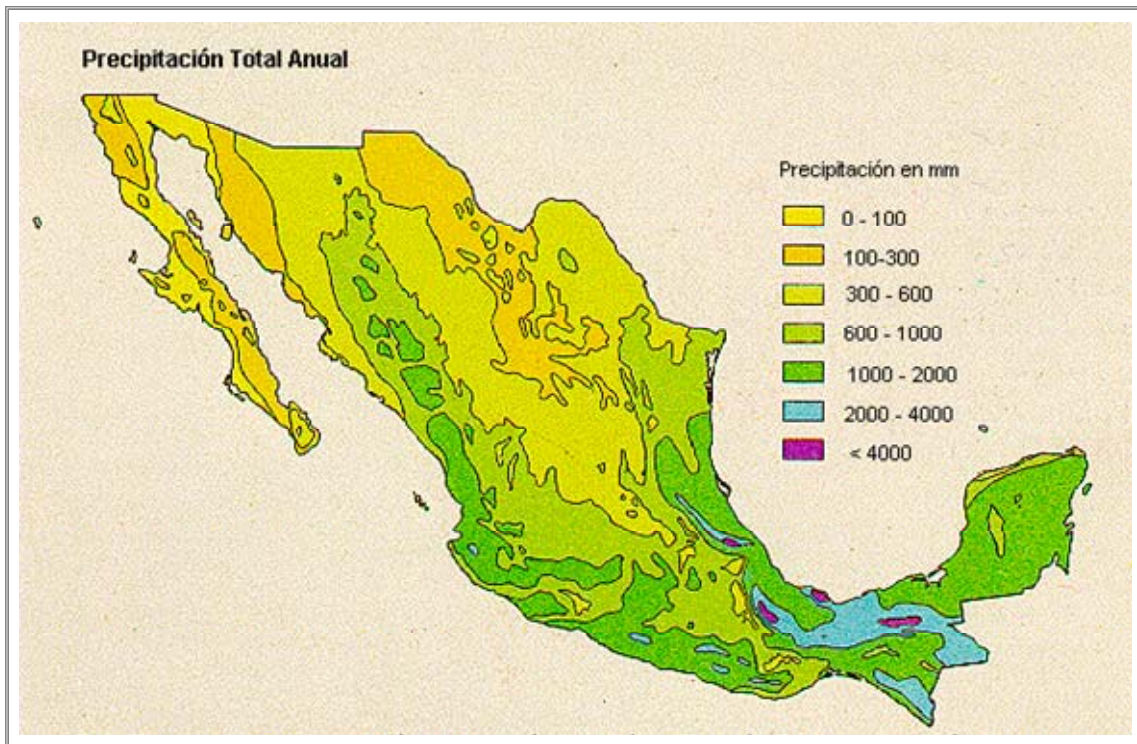
Los factores de estrés abiótico como la sequía, salinidad, temperaturas extremas (calor y frío) y compuestos tóxicos específicos, afectan el crecimiento y desarrollo de las plantas y la productividad de la cosecha (Boyer, 1982; Rosegrant y Cline, 2003).

En el campo, los cultivos y otras plantas están rutinariamente sujetos a una combinación de diferentes agobios abióticos. En las áreas que sufren de sequía, por ejemplo, muchos cultivos se enfrentan a una combinación de sequía y otros agobios, tales como calor o salinidad (Heyne y Brunson, 1940). La sequía y el estrés por calor representan un ejemplo excelente de dos diferentes agobios

abióticos que ocurren en el campo simultáneamente, especialmente en regiones semi-áridas o áridas (Mittler y col., 2001; Rizhsky y col., 2002; Mittler, 2006).

### **2.1.1 Sequía**

Después de miles de años en los cuales el agua ha sido un recurso abundante en la mayor parte del planeta, la situación actual ha cambiado abruptamente hasta el punto en que, en particular en las regiones más áridas, la escasez de agua se ha convertido en la mayor amenaza para la seguridad de los alimentos, la salud humana y los ecosistemas naturales (Seckler y col., 1999). Se estima que para el año 2030 la población mundial incrementará en 2 billones (United Nations Population Division, 1998). Con el incremento en la aridez y la creciente población, el agua se convertirá en un recurso aún más escaso (Postel, 2000). La agricultura es la actividad humana 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 errática y escasa precipitación, comúnmente menos de 600 mm anuales, principalmente en el norte del país (Fig. 1), limita fuertemente la actividad agrícola en áreas de temporal e influencia de manera determinante la dinámica y productividad de los cultivos y las comunidades vegetales naturales (Aguado-Santacruz y García-Moya, 1998).



**Figura 1.** Precipitación total anual en México. Tomada del Instituto Nacional de estadística, geografía e informática. Dirección general de geografía. Cartas de precipitación total anual. Escala 1:1 000 000. México

### 2.1.2 Salinidad

La salinización de la tierra y el agua es un problema que ha ido creciendo en los últimos años en muchas áreas del planeta. La salinidad afecta el crecimiento y desarrollo de la planta y la productividad causando la pérdida de cultivos completos. La mayoría de los cultivos comerciales son sensibles a bajas concentraciones de sal (Zhu, 2001). Los sistemas de irrigación de la tierra son particularmente propensos a la salinización; cerca de la mitad de los sistemas de irrigación existentes en el mundo están bajo la influencia de la salinización o alcalinización (Szabolcs, 1994) y a pesar de su área relativamente pequeña, la



tierra irrigada produce un tercio de la alimentación mundial, así que la salinización de la tierra por irrigación es un problema grave (Szabolcs, 1994). En el 2002, la FAO estimó que alrededor de 20-30 millones de hectáreas de tierra irrigada estaban seriamente dañadas por la salinidad y que 0.25 a 0.50 millones de hectáreas de la producción se pierden cada año como resultado de la acumulación de sales.

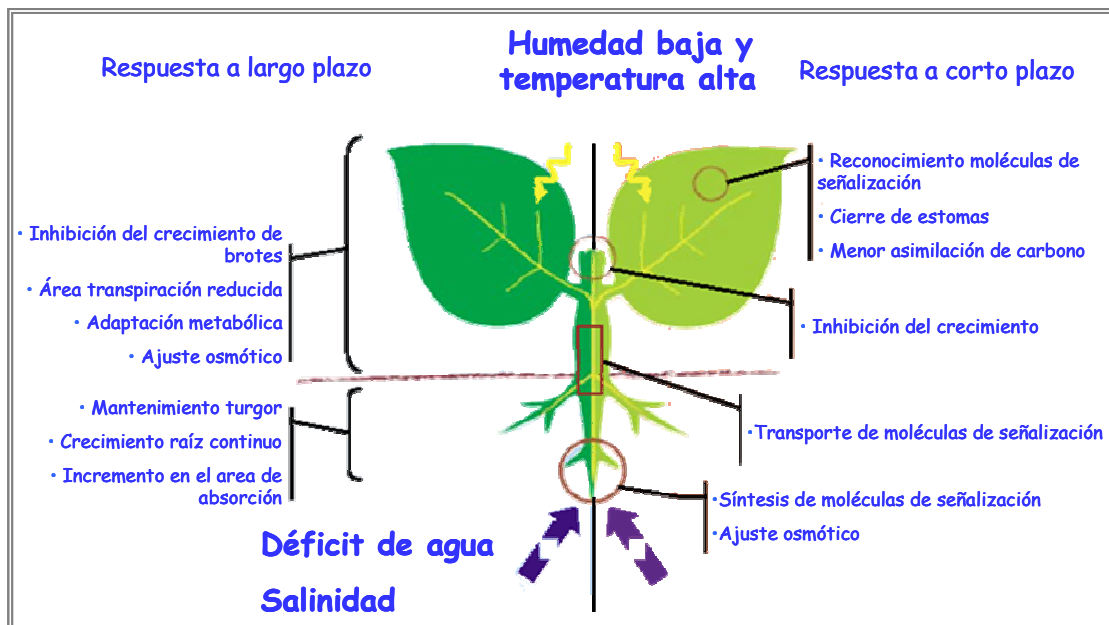
### **2.1.3 Temperaturas extremas**

Once de los últimos doce años (1995-2006) están entre los doce años más calientes en el registro instrumental de la temperatura de la superficie de la tierra desde 1850 (IPCC, 2007). El Panel Intergubernamental sobre Cambio Climático (IPCC; por sus siglas en inglés) ha estimado que sin la acción adicional para reducir emisiones de gases invernadero la temperatura superficial aumentará 1.8 a 4.0 °C este siglo (IPCC, 2007). Uno de los principales efectos del incremento en la temperatura es el estrés por calor en las plantas. La mayoría de los cultivos están expuestos a estrés por calor durante su ciclo de vida (Stone, 2001). La exposición a estrés por calor, reduce el rendimiento de los cereales y disminuye su calidad (Maestri y col., 2002). Por otro lado el término “temperaturas bajas” se utiliza para designar aquellas temperaturas por encima o por debajo de 0° C que causan daño en las plantas. Las bajas temperaturas son un factor crítico en la distribución de las comunidades vegetales y en el crecimiento de importantes cultivos como la soya y el maíz (Kratsch y Wise, 2000).

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 resistentes a través del mejoramiento genético tradicional y la producción de plantas transgénicas.

## **2.2 Respuesta de las plantas al estrés abiótico**

La respuesta a corto plazo al estrés abiótico involucra la síntesis de moléculas de señalización, el cierre de los estomas y como consecuencia una menor asimilación de carbono (Fig. 2). Por otro lado la respuesta a largo plazo implica la inhibición del crecimiento de brotes y un incremento en el área de absorción mediante el continuo crecimiento de la raíz (Fig. 2). La respuesta y adaptación de las plantas a la sequía, salinidad o calor han sido sujetos de intensa investigación (Bartels y Sunkar, 2005; Kotak y col., 2007). Sin embargo, los mecanismos moleculares de las plantas sometidas a una combinación de agobios abióticos han sido muy poco estudiados (Mittler, 2006). Estudios recientes han revelado que la respuesta de las plantas a una combinación de dos diferentes agobios abióticos, tales como la sequía y el calor, es única (Mittler, 2006). El estrés por sequía, calor y salinidad producen en las plantas respuestas en común: causan estrés osmótico, inhiben el metabolismo general y fotosintético de la planta, rompen el equilibrio celular y generan especies reactivas de oxígeno, lo que lleva a un estrés oxidativo (Sreenivasulu y col., 2007). También se ha mostrado que cientos de genes y sus productos responden a estos agobios a nivel transcripcional y traduccional (Bartels y Sunkar, 2005); además un gran número de herramientas han sido usadas para estudiar su función en la adaptación de las plantas al estrés.



**Figura 2.** Respuesta y adaptación de las plantas al estrés abiótico. Tomada y modificada de Chavez y col., 2003

### 2.2.1 Efecto del estrés por sequía

El agua es el principal elemento en las células de las plantas. El contenido de agua varía de 60 a 95% del peso fresco en tejidos y órganos. Constituye el disolvente de las moléculas hidrofílicas y es el medio para las reacciones bioquímicas y también está involucrado como un reactivo en procesos como la fotosíntesis. En condiciones de déficit de agua se ha observado una disminución de la actividad biológica en diferentes niveles de organización que afectan el metabolismo y crecimiento de la planta (Chapin y col., 1988). El cierre de los estomas, como una respuesta fisiológica a la sequía, disminuye la pérdida de agua a través de las hojas; y restringe la entrada de  $\text{CO}_2$  por lo que disminuye su asimilación y esto lleva a una tasa fotosintética baja (Fig. 2) (Chaves, 1991). El ácido abscísico (ABA) ha sido identificado como una de las señales químicas

involucradas en la regulación del funcionamiento de los estomas durante el déficit de agua (Wilkinson y Davies, 2002). Los cambios en el balance de carbono, descenso en la asimilación de nutrientes, en particular del nitrógeno; y los cambios hormonales como la producción de ABA, todo ello como consecuencia del déficit de agua, son los responsables de la reducción del crecimiento de la planta (Chapin y col., 1988).

#### **2.2.1.1 Percepción de la sequía y transducción de la señal**

La percepción del déficit de agua en las células de las plantas es un área poco explorada. Recientes estudios han mostrado que el déficit de agua, seguido del estrés osmótico, activa la expresión de un osmosensor (AtHTK1) en *Arabidopsis thaliana* (Urao y col., 1999; Wohlbach y col., 2008). Además NtC7 y Cre1 también han sido propuestos como probables candidatos para sensar el estrés osmótico en plantas (Reiser y col., 2003; Tamura y col., 2003).

La raíz tiene un papel esencial en la percepción de la sequía y la transmisión resultante de mensajes químicos que viajan hacia los brotes a través del xilema. La naturaleza de este mensaje es todavía desconocido, aunque se ha sugerido que el ABA tiene un papel importante (Bahrun y col., 2002). El ABA que viaja en la savia hacia las hojas durante la sequía causa cierre de los estomas y esto le permite a la planta controlar la pérdida de agua durante la transpiración (Davies y col., 1994). El control de la apertura de los estomas por ABA involucra cambios en la expresión génica, alteraciones en la turgencia de las células guarda, tráfico de membranas, reorganización del citoesqueleto y la participación del metabolismo

de azúcares y ácidos orgánicos (Hetherington, 2001). Sin embargo, la hipótesis de que el ABA regula el cierre de los estomas durante la sequía es inconsistente con otros reportes (Holbrook y col., 2002), sugiriendo que quizá participan otros compuestos o mecanismos.

Las proteínas que están involucradas en la transducción de la señal en respuesta al estrés son protein-cinasas (MAPK), fosfatasas, y proteínas que dependen de  $Ca^{2+}$ . También participan segundos mensajeros derivados del metabolismo de los fosfolípidos, tales como inositol 1, 4, 5-trifosfato y ácido fosfatídico (Bartels y Sunkar, 2005).

#### **2.2.1.2 Estrés oxidativo**

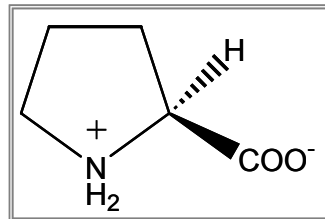
Durante la sequía se altera la fotosíntesis, como consecuencia de esto, una fracción de energía lumínica interceptada por los fotosistemas no es empleada, esto lleva a la foto-reducción parcial del oxígeno y la generación de ROS (reactive oxigen species) tales como radicales hidroxilo, superóxido y peróxido de hidrógeno, altamente tóxicos (Niyogi, 1999). El estrés oxidativo es un término general usado para describir el estado de daño causado por ROS. En un inicio para eliminar el exceso de luz, las plantas pueden prevenir su absorción, por ejemplo ajustando el ángulo de sus hojas al sol, mecanismo conocido como paraheliotropismo (Ehleringer y Forseth, 1980) o perdiendo clorofila (Havaux y Tardy, 1999), también pueden desviar la luz absorbida mediante procesos como la disipación térmica. El proceso de disipación térmica mejor caracterizado involucra el ciclo de las xantofilas (Demmig-Adams y Adams, 1996). Sin embargo, cuando

los mecanismos anteriores no son suficientes para sobrellevar el exceso de energía, participan antioxidantes enzimáticos tales como peroxidasas y superóxido dismutasas y también antioxidantes no enzimáticos como el ácido ascórbico, el glutatión y el  $\alpha$ -tocoferol (Alscher y col., 1997; Foyer y col., 1997; Anderson y Davis, 2004). Los antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos en las plantas protegen a las células del daño oxidativo mediante el secuestro de ROS (Shao, 2008).

### **2.2.1.3 Estrés osmótico**

Para tolerar el estrés osmótico en las plantas durante periodos de sequía el mecanismo que participa es el mantenimiento de la turgencia mediante el ajuste de la presión osmótica en las células a través de la síntesis de osmolitos tales como la prolina, glicina betaína y azúcares (Delauney y Verma, 1993; Rhodes y Hanson, 1993).

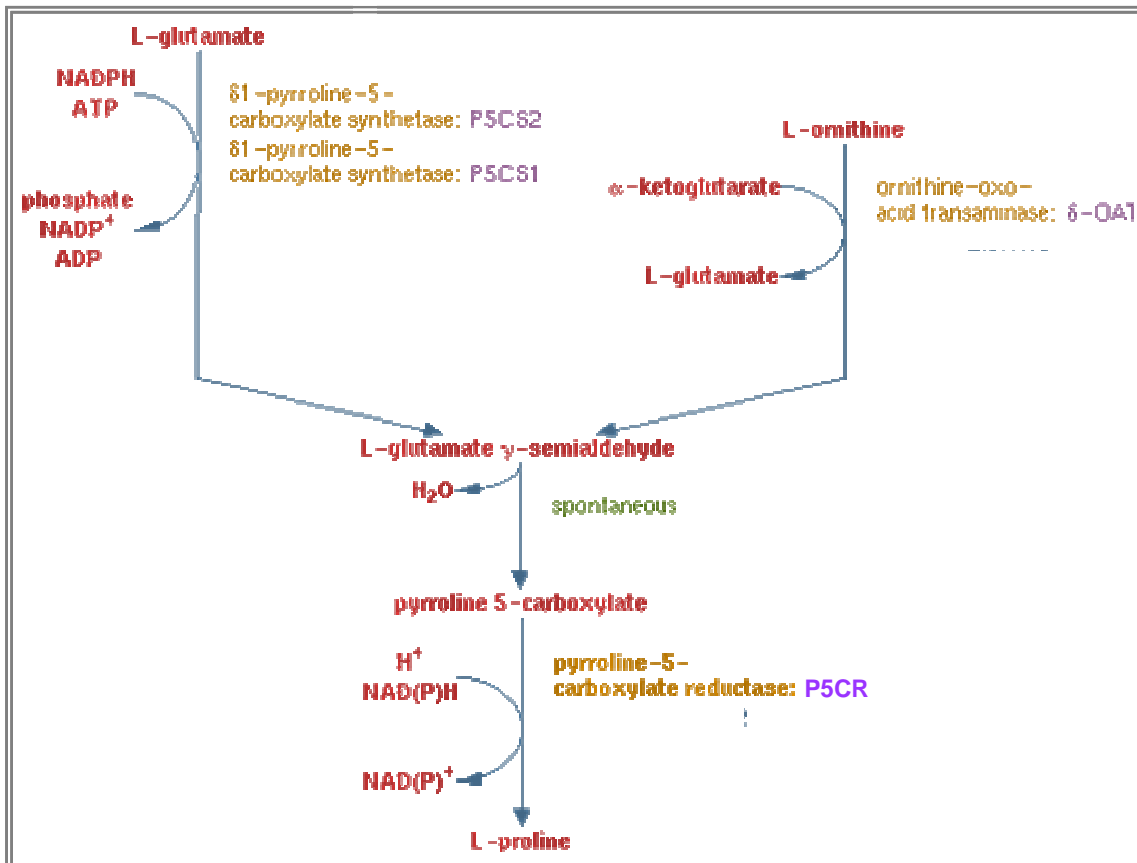
La prolina (Fig. 3) es uno de los osmolitos que más se acumula en plantas, no solamente en condiciones de déficit de agua, sino en salinidad y temperaturas extremas, entre otros agobios abióticos (Delauney y Verma, 1993; Jiménez-Bremont y col., 2006; Tripathi y col., 2007). En *Arabidopsis thaliana* bajo estrés salino la prolina puede representar hasta el 20% del pool de aminoácidos libres (Verbruggen y col., 1993). La prolina actúa como osmoprotector, también puede estabilizar proteínas, funciona como un secuestrador de radicales hidroxilo, estabiliza las membranas celulares interactuando con los fosfolípidos y es fuente de carbono y nitrógeno (Kavi Kishor y col., 2005).



**Figura 3.** Estructura química de la L-prolina

En plantas, la biosíntesis de la prolina ocurre a través de dos vías a partir de ornitina o glutamato; sin embargo, la biosíntesis de prolina a partir de glutamato parece ser la vía predominante, especialmente bajo condiciones de estrés (Fig. 4) (Delauney y Verma, 1993). La enzima delta 1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS;  $\gamma$ -glutamil cinasa EC 2.7.2.11 y glutamato-5-semialdehído deshidrogenasa EC 1.2.1.41) cataliza el paso limitante en la biosíntesis de prolina a partir del glutamato en plantas (Hu y col., 1992). En *A. thaliana*, la enzima P5CS es codificada por dos genes llamados *AtP5CS1* y *AtP5CS2*. La caracterización de estos genes en mutantes por inserción de T-DNA en Arabidopsis indica que el gen *AtP5CS1* es necesario para la acumulación de prolina bajo estrés osmótico (Székely y col., 2007). La relación entre la síntesis de prolina y la tolerancia al estrés hídrico y salino ha sido demostrada en plantas transgénicas de tabaco y trigo (Kavi Kishor y col., 1995; Sawahel y Hassan, 2002). La degradación de la prolina es catalizada por la acción de dos enzimas, la prolina deshidrogenasa (PD; EC 1.5.99.8) y la 1-pirrolina-5-carboxilato deshidrogenasa (P5CD; EC 1.5.1.12) (Kiyosue y col., 1996). Como ha sido mencionado anteriormente el ABA es una hormona que juega un papel importante en la señalización cuando las plantas

están bajo estrés por sequía (Bartels y Sunkar, 2005; Park y col., 2008). En Arabidopsis y arroz se observó que la expresión del gen *P5CS* es regulada por ABA (Yoshiba y col., 1995; Igarashi y col., 1997).



**Figura 4.** Biosíntesis de prolina en plantas. Tomada de: <http://plantcyc.org/>

## 2.2.1.4 Proteínas y metabolitos en respuesta a la sequía

### 2.2.1.4.1 Proteínas LEA

Un grupo de proteínas altamente hidrofílicas conocidas como LEA (late emryogenesis abundant) se acumulan en la semilla durante el estado tardío de maduración y durante el déficit de agua en plantas (Dure y Chlan, 1981; Garay-



Arrollo y col., 2000). La acumulación de las proteínas LEA durante la embriogénesis correlaciona con el incremento en los niveles de ABA y la tolerancia al déficit de agua (Galau y col., 1986). Se ha sugerido que muchas proteínas LEA tienen la habilidad de estabilizar enzimas lábiles bajo condiciones de estrés (Bravo y col., 2003; Grelet y col., 2005; Reyes y col., 2005; Sanchez-Ballesta y col., 2004). Sin embargo, debido a que esta propiedad no ha sido reportada para todos los grupos de proteínas LEA no puede establecerse como una propiedad general de estas proteínas. Aunque el papel funcional de las proteínas LEA es aún desconocido, existe evidencia de su participación en la aclimatación al estrés. Por ejemplo, la expresión de la proteína LEA de cebada, HVA1, del grupo 3 de proteínas LEA, confiere tolerancia a déficit hídrico en arroz (Xu y col., 1996) y en trigo (Sivamani y col., 2000). La presencia de las proteínas LEA también ha sido asociada a la tolerancia al congelamiento (Danyluk y col., 1994; 1998; Ismail y col., 1999; Puhakainen y col., 2004). Además una fuerte inducción en la expresión de genes LEA ha sido encontrada en la planta de resurrección tolerante a la sequía *Craterostigma plantagineum* durante el déficit hídrico (Piatkowski y col., 1990).

#### **2.2.1.4.2 Acuaporinas**

La deshidratación que ocurre durante el déficit hídrico en plantas requiere cambios en el flujo de agua para permitir a las células y tejidos adaptarse a las condiciones de estrés. Las acuaporinas son proteínas canal presentes en las membranas plasmática e intracelulares de las células de las plantas, en donde facilitan el transporte de agua y/o solutos neutrales pequeños o gases (Maurel y col., 2008).

La transcripción de genes de acuaporinas ha sido examinada en varias condiciones de estrés abiótico y se ha observado que algunos de estos genes son sub-expresados mientras que otros son sobre-expresados (Alexandersson y col., 2005; Jang y col., 2004).

#### **2.2.1.4.3 Poliaminas**

Las poliaminas putrescina, espermidina y espermina son policationes de bajo peso molecular cargados positivamente a un pH fisiológico. Esta propiedad le permite a las poliaminas interactuar con macromoléculas cargadas negativamente como ADN, ARN, proteínas y fosfolípidos; y de esta forma están involucradas en el desarrollo y en múltiples procesos fisiológicos (Galston y Kaur, 1990). En plantas, la putrescina es sintetizada por la descarboxilación de la arginina u ornitina catalizada por la arginina descarboxilasa (ADC; EC 4.1.1.19) o la ornitina descarboxilasa (ODC; EC 4.1.1.17) respectivamente. La adición de dos grupos aminopropilo a la putrescina en dos reacciones sucesivas catalizadas por la espermidina sintasa (SPDS; EC 2.5.1.16) y la espermina sintasa (SPMS; EC 2.5.1.22) lleva a la formación de la espermidina y espermina respectivamente. Los grupos aminopropilo provienen de la descarboxilación de la S-adenosilmetionina por la acción de la enzima S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC; EC 4.1.1.50). A la fecha han aumentado los reportes que muestran que las poliaminas se acumulan en respuesta a estrés y participan en la tolerancia de las plantas a múltiples agobios abióticos (Bouchereau y col., 1999; Kasukabe y col., 2004; Liu y col., 2007b). Plantas transgénicas de arroz que expresan el gen *adc* de *Datura stramonium* producen niveles elevados de putrescina bajo condiciones de estrés

por sequía comparado con plantas control, esto conlleva a niveles elevados de espermidina y espermina y mejora la tolerancia a estrés por sequía (Capell y col., 2004). Recientemente se mostró la tolerancia a estrés abiótico en tabaco transgénico mediante la sobre-expresión de la *samdc* de *Dianthus caryophyllus* (Wi y col., 2006). Las funciones que han sido propuestas por las cuales las poliaminas tienen un papel de protección durante el estrés son que actúan como antioxidantes, secuestran radicales libres y estabilizan las membranas celulares (Muscarelli y col., 1995; Ha y col., 1998; Verma y Mishra, 2005). Recientemente se ha sugerido que la regulación de la expresión génica mediada por una vía de señalización dependiente de poliaminas, activa genes de respuesta a estrés como el factor de transcripción DREB, la proteína rd29A, entre otros (Kasukabe y col., 2004; Uehara y col., 2005).

### **2.2.2 Efecto del estrés salino**

Se han identificado dos componentes durante el estrés salino en plantas; el componente osmótico, debido a la alteración en el potencial osmótico y el componente iónico relacionado con la acumulación de iones principalmente  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Estos eventos están asociados a la generación de ROS, como consecuencia del daño en la fotosíntesis. El estrés salino afecta el crecimiento y desarrollo de la planta como consecuencia del desequilibrio en el potencial hídrico y en la distribución de iones. Durante el estrés salino se observa una reducción en el crecimiento de la raíz y de las hojas (Yeo y col., 1991; Neumann, 1993; Rodríguez y col., 1997; Passioura y Munns, 2000; Dash y Panda, 2001). Además la salinidad causa un incremento en la biosíntesis y acumulación de ABA (Luo y col., 1992), y

también es responsable del daño en las estructuras celulares, la inactivación de una gran cantidad de enzimas, así como del daño en el metabolismo fotosintético (Zhu, 2002). Las protein-cinasas participan en la transducción de varias señales intra y extracelulares, incluyendo las señales por estrés. El papel de muchas cinasas en respuesta a estrés salino ha sido reportado (Zhang y col., 2006). Durante el estrés salino se sintetizan osmolitos compatibles tales como prolina, glicina betaína y azúcares (Delauney y Verma, 1993; Rhodes y Hanson, 1993) y además se acumulan poliaminas (Chattopadhyay y col., 2002). La sobre-expresión constitutiva de proteínas LEA de cebada confieren tolerancia al estrés salino en plantas de arroz transgénico, aunque efectos similares después de la adición de manitol, sugiere que las proteínas LEA protegen contra el estrés osmótico que origina el NaCl, más que contra el componente ión-específico (Xu y col., 1996). Al igual que en el estrés por sequía, en el estrés salino se generan ROS como un efecto secundario y para sobrellevar el estrés participan los mecanismos de detoxificación no enzimáticos y enzimáticos (Mittler, 2002). De la descripción acerca de los efectos de la sequía y el estrés salino en las plantas que ha sido mencionada se puede deducir que la respuesta temprana al estrés salino es esencialmente idéntica a la sequía. La diferencia más importante es el estrés iónico que se genera en la planta como consecuencia de la acumulación de iones  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , el cual se describe a continuación.

### **2.2.2.1 Estrés iónico**

El catión sodio ( $\text{Na}^+$ ) es tóxico para la mayoría de los organismos, excepto para los organismos halófitos, quienes poseen mecanismos específicos para mantener

la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  baja (Inan y col., 2004). Entre los efectos más comunes de la salinidad del suelo es la inhibición en el crecimiento de la planta por el  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  (Dash y Panda, 2001). La exclusión del exceso de  $\text{Na}^+$  del citoplasma y su acumulación en la vacuola representa uno de los mecanismos que ocurre durante el estrés salino en plantas tolerantes principalmente. El secuestro del  $\text{Na}^+$  en vacuola es mediado por el antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en el tonoplasto (Apse y col., 1999) mediante el uso de energía generada por reacciones enzimáticas (Blumwald y Gelli, 1997). La vía de señalización SOS (salt overlay sensitive) está involucrada en regular el equilibrio de  $\text{Na}^+$  (Zhu, 2001). La vía inicia con SOS3, una proteína de unión a calcio, quien sensa el cambio en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y transduce la señal río abajo (Liu y Zhu, 1998; Ishitani y col., 2000). SOS2 codifica a una proteín-cinasa treonina/serina (Liu y col., 2000; Halfter y col., 2000). SOS3 interactúa físicamente con SOS2 y así SOS3 promueve la actividad cinasa de SOS2 de una forma dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$  (Majan y col., 2006a; b). En esta vía de señalización abajo de SOS3-SOS2 está SOS1, un antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  localizado en la membrana plasmática, responsable de la exclusión celular de  $\text{Na}^+$  (Shi y col., 2000), además se ha reportado que mejora o reduce la tolerancia a sal cuando es sobre-expresado o interrumpido, respectivamente (Qiu y col., 2004).

### **2.2.3 Efecto del estrés por calor**

El estrés por calor transitorio o constante causa cambios fisiológicos y bioquímicos en las plantas, afectando su crecimiento y desarrollo (Wahid y col., 2007). Las altas temperaturas pueden causar también cambios morfológicos, por ejemplo, quemaduras en hojas, ramas y tallos, senescencia y abscisión de las hojas,

inhibición en el crecimiento de brotes y raíces y daño y decoloración en los frutos (Guilioni y col., 1997; Ismail y Hall, 1999; Vollenweider y Gunthardt-Goerg, 2005). En monocotiledóneas el estrés por calor puede causar necrosis en las puntas de las hojas; además el desarrollo reproductivo es afectado, y puede darse el caso de que no haya producción de flores, o si se producen no dan frutos o semillas (Hall, 1992; Ahmed y Hall, 1993). Algunos efectos del estrés por calor son similares a los ocurridos bajo estrés por sequía, como el cierre de los estomas y el daño en el aparato fotosintético (Wahid y col., 2007). Las altas temperaturas reducen la fotosíntesis cambiando la organización estructural de los tilacoides (Karim y col., 1997). La sensibilidad de la fotosíntesis al estrés por calor es debido principalmente al daño en los componentes del fotosistema II (PSII) localizado en las membranas de los tilacoides de los cloroplastos (Al-Khatib y Paulsen, 1999). El PS II es altamente termolábil y su actividad es reducida o incluso parcialmente interrumpida bajo estrés por calor (Bukhov y col., 1999; Camejo y col., 2005). Los efectos sobre el aparato fotosintético están asociados con la producción de ROS. Al igual que el estrés hídrico y el estrés salino, el estrés por calor induce estrés oxidativo. La generación de ROS que incluye: el oxígeno singlete ( $^1\text{O}_2$ ), el radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ), es un síntoma de daño celular debido a la alta temperatura (Liu y Huang, 2000). ROS causa la peroxidación de los lípidos de la membrana, lo que lleva a la disminución de su permeabilidad y modifica sus funciones (Xu y col., 2006). La protección contra el estrés oxidativo es un componente importante que determina la sobrevivencia de las plantas bajo estrés por calor (Wahid y col., 2007). Las plantas han desarrollado sistemas de destoxificación no enzimáticos y enzimáticos,

descritos en capítulos anteriores, que protegen a las células del daño oxidativo. Además los datos disponibles sugieren que algunas moléculas de señalización causan un incremento en la capacidad antioxidativa de las células durante el estrés por calor (Gong y col., 1997; Dat y col., 1998). Como se mencionó anteriormente un mecanismo de adaptación en plantas que crecen bajo estrés abiótico, como la salinidad, el déficit de agua y las temperaturas extremas, es la acumulación de ciertos compuestos orgánicos, a los que generalmente se definen como osmolitos compatibles (Wahid y col., 2007). Por ejemplo, la acumulación de prolina, glicina betaína y azúcares bajo estrés por calor, ha sido reportado en caña de azúcar (Wahid y Close, 2007).

#### **2.2.3.1 Percepción del calor y transducción de la señal**

Ha sido sugerido que el cambio en la fluidez de la membrana juega un papel central en la percepción de altas y bajas temperaturas y por lo tanto en la modificación de la expresión génica (Maestri y col., 2002; Wahid y col., 2007). La saturación de los lípidos en la membrana es considerada un elemento importante en la tolerancia a altas temperaturas (Maestri y col., 2002). Plieth (1999) propuso que canales permeables a  $\text{Ca}^{2+}$  localizados en la membrana son capaces de detectar cambios en la fluidez de la membrana lo que produce cambios conformacionales y/o fosforilación/desfosforilación de proteínas. La rigidez en las membranas de los tilacoides altera los perfiles de expresión de los genes que codifican para proteínas de choque térmico. Esto ha sugerido que los mecanismos para sensar la temperatura quizá están localizados en estas membranas (Horváth y col., 1998). La susceptibilidad de las membranas de los tilacoides al aumento de

la temperatura, debido a su carácter altamente insaturado y a la presencia de fotosistemas, quienes son frágiles a los cambios de temperatura apoyan la idea de que las membranas de los tilacoides actúan como sensores (Sung y col., 2003). Evidencias recientes muestran la participación de diversas moléculas involucradas en la transducción de señales en respuesta al estrés por calor, tales como el inositol 1,4,5-trifosfato (Liu y col., 2006a), el  $\text{Ca}^{2+}$  (Li y col., 2004; Liu y col., 2005) y fosfatasas (Liu y col., 2007a). El  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico transduce las señales a las MAPK, también ha sido descrito que las MAPK se activan aparentemente debido a cambios en la fluidez de la membrana (Sangran y Dhindsa, 2002). Adicionalmente, fitohormonas como el ABA, ácido salicílico y el etileno han sido implicadas en la señalización durante el estrés por calor en diferentes especies de plantas (Larkindale y Huang, 2006; Larkindale y col., 2005; Liu y col., 2006b). Por ejemplo se ha reportado la inducción de varias proteínas de choque térmico por ABA, lo que quizá pueda ser un mecanismo para conferir termotolerancia a las plantas (Wahid y col., 2007). Los factores de transcripción que participan en la respuesta de las plantas al estrés por calor Hsfs (heat stress transcription factors) son los componentes finales de la vía de transducción de señales, los Hsfs median la expresión de las proteínas de choque térmico y otros transcritos inducidos por calor. En plantas, existen tres clases de Hsfs: A, B y C, que difieren en su dominio de oligomerización (región HR-A/B). Además, las plantas tienen múltiples genes que codifican para los Hsfs, en Arabidopsis por ejemplo se han descrito 21 genes (Kotak y col., 2007). Los Hsfs son proteínas inactivas encontradas en el citoplasma. El calor causa su activación mediante el dominio de oligomerización y, eventualmente, son recompartimentalizadas al núcleo, en donde se unen a las



secuencias HSE (heat stress promoter elements) presentes en la región promotora de los genes de respuesta a estrés por calor. Las secuencias HSE consisten de repetidos del motivo palindrómico 5' –AGAAnnTTCT-3', localizadas río arriba de la caja TATA en los genes inducidos por calor (Pelham, 1982).

### **2.2.3.2 Proteínas de choque térmico**

La acumulación de proteínas de choque térmico, bajo el control de los factores de transcripción de respuesta a calor, juega un papel importante en la respuesta al estrés por calor y termotolerancia adquirida en las plantas. Las proteínas de choque térmico fueron identificadas en 1974 por Tissieres y sus colaboradores (Tissieres y col., 1974). Actúan como chaperonas moleculares en el control de la calidad de las proteínas: ayudan en el doblamiento, distribución intracelular, ensamblaje y degradación de proteínas (Hartl y Hayer-Hartl, 2002; Haslbeck, 2002; Young y col., 2003; Soll y Schleiff, 2004; Wegele y col., 2004) así como en la resolubilización de agregados de proteínas (Bösl y col., 2006). En *A. thaliana* se han identificado cuatro familias de proteínas de choque térmico, distinguidas por su peso molecular, LMW Hsps (low molecular weight heat shock proteins), Hsp70, Hsp90 y Hsp100 (Wahid y col., 2007). En *A. thaliana* y otras plantas, varias Hsps han sido inducidas por bajas temperaturas, estrés osmótico, salinidad, estrés oxidativo, sequía, herida y exposición a metales pesados (Swindell y col., 2007).

## **2.3 El nopal: modelo de estudio**

El nopal (*Opuntia spp.*) ha representado para México, en su desarrollo histórico, uno de los recursos naturales más relevantes y de mayor significado cultural. Es

una planta típica dentro del paisaje mexicano, y un importante símbolo de identidad para los mexicanos (Fig. 5). El nopal se distribuye en América, y México es el país con mayor número de especies, por lo que se puede considerar como centro de origen y diversidad de este género. El nopal pertenece al género *Opuntia* y a la familia *Cactaceae*. Existen casi 300 especies del género *Opuntia* (Scheinvar, 1995), de las cuales en México, Bravo-Hollis (1978) registró 104 especies y variedades, sin embargo Guzmán y col. (2003) registraron 83 especies. En México el hombre ha utilizado al nopal desde épocas prehispánicas, donde jugó un papel importante en la economía agrícola del imperio Azteca.



**Figura 5.** *Opuntia* spp

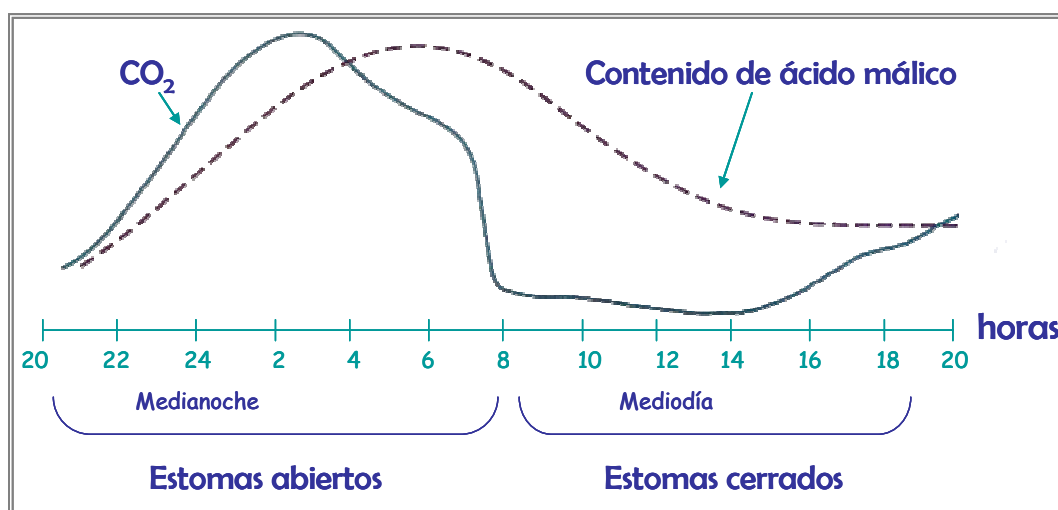
### **2.3.1 Usos del nopal**

Actualmente los principales usos del nopal son como alimento y forraje (Pimienta, 1990; Barbera, 1995). Como alimento, *Opuntia* puede ser consumido ya sea como hortaliza (nopalitos) o fruto (tunas). Sus flores se usan para preparar bebidas antidiuréticas; con los frutos se elaboran jugos, jaleas, miel, pastas y mermeladas; de sus semillas se obtiene aceite; con los nopalitos se preparan remedios antidiabéticos y el cladodio (penca) es el medio de cultivo del insecto “cochinilla” (*Dactilopius coccus costa*) del cual se obtiene el colorante grana cochinilla (Barbera, 1995; Reyes-Agüero y col., 2005).

### **2.3.2 Características morfológicas y fisiológicas del nopal**

El nopal se caracteriza por tener cladodios planos, gruesos y suculentos y por la presencia de areolas con actividad meristemática lo que permite la formación de espinas (hojas modificadas), de un nuevo cladodio, flores y frutos. Esta planta posee raíces secundarias muy superficiales que se extienden ampliamente en el terreno y estomas hundidos (Rebman y Pinkava, 2001). El nopal ha desarrollado adaptaciones que le permiten enfrentar las adversas condiciones climáticas de las zonas áridas. La mayoría de sus características morfológicas y fisiológicas están relacionadas con un uso muy eficiente del agua. Su forma globulosa y robusta le permite almacenarla, al mismo tiempo que disminuye la superficie de la planta expuesta al sol (Nobel, 1988). La existencia de una cutícula impermeable que cubre toda la planta evita la pérdida de agua por transpiración; la entrada y salida del agua está regulada por los estomas (Nobel, 1988). Las especies del género *Opuntia* realizan fotosíntesis por medio de un mecanismo conocido como metabolismo ácido de las crasuláceas, que les permite realizar la fotosíntesis con

un desfaseamiento en el tiempo; durante la noche, cuando la temperatura es menor, se abren los estomas para realizar el intercambio gaseoso, y el bióxido de carbono captado es almacenado en las vacuolas de las células de la planta en forma de ácido málico. Durante el día cesa la transpiración y, aprovechando la luz solar, la planta realiza la síntesis de carbohidratos utilizando el bióxido de carbono almacenado durante la noche (Fig. 6) (Nobel, 1988). Al no transpirar durante el día, la planta evita la pérdida excesiva de agua y de esta forma las Cactáceas como el nopal resisten la sequía al utilizar con mayor eficiencia el agua. Lo anterior ha permitido su diversificación y distribución en ambientes áridos y semiáridos, donde el agua es la principal limitante para el desarrollo vegetal.



**Figura 6.** Metabolismo ácido de las crasuláceas en *Opuntia*

La falta de hojas y la presencia de espinas o pelos refrigerantes, ayuda a la planta a disminuir el calor provocando por la incidencia de los rayos solares (Rebman y Pinkava, 2001). También desempeña un papel importante en la protección de la

fauna local (Rebman y Pinkava, 2001). Por lo anterior, *Opuntia* es uno de los recursos de mayor potencial en el aprovechamiento de regiones áridas y semiáridas, que día a día se incrementan, así como en la prevención de la erosión del suelo y su desertificación.

Además de que las Cactáceas muestran características fisiológicas y morfológicas que les han permitido adaptarse a condiciones de sequía, la respuesta al déficit de agua, quizá involucra la acción de diferentes mecanismos de percepción y señalización. Dichos mecanismos llevarán al final a la expresión diferencial de genes que finalmente le permitirán realizar los ajustes metabólicos necesarios para tolerar el estrés y sobrevivir.

A la luz del cambio climático y la desertificación, el nopal, ha adquirido importancia como un sistema efectivo de alimentación por sus partes vegetativas y por su fruto; además es una planta modelo atractiva para estudiar los mecanismos de tolerancia a sequía y calor.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo general

Aislar e identificar genes de nopal (*Opuntia streptacantha*) inducidos en estrés abiótico.

#### 3.2 Objetivos específicos

**A) Aislamiento e Identificación de genes involucrados en la respuesta a estrés hídrico y calor en *Opuntia streptacantha*.**

1. Caracterizar a *Opuntia streptacantha* en el estrés hídrico y calor mediante la cuantificación de prolina.
2. Aislar genes involucrados en estrés hídrico y calor mediante una genoteca sustractiva.
3. Confirmar la expresión diferencial de los principales genes seleccionados mediante RT-PCR.

**B) Análisis de la expresión del gen delta 1- pirrolina-5-carboxilato sintetasa (*p5cs*) y la acumulación de prolina en respuesta a salinidad en *Opuntia streptacantha*.**

1. Caracterizar a *Opuntia streptacantha* en el estrés salino mediante la medición de parámetros morfológicos como la anchura y grosor del cladodio y longitud de la raíz y por otro lado la cuantificación de prolina y clorofila.
2. Aislar el gen que codifica a la *p5cs*.
3. Analizar la expresión diferencial de la *p5cs* en cladodios de *Opuntia streptacantha* bajo estrés salino.

4. Medir la actividad enzimática de la P5CS en cladodios de *Opuntia streptacantha* bajo estrés salino.

**C) Análisis de 11 uni-genes en mutantes por inserción de *Arabidopsis thaliana*.**

1. Solicitar al ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center; Ohio State University, Columbus, OH) las líneas insercionales correspondientes a 11 uni-genes aislados en la genoteca sustractiva.
2. Identificar las líneas homocigotas de *A. thaliana* para cada uni-gen.
3. Analizar el fenotipo de las líneas mutantes de *A. thaliana* en condiciones de estrés abiótico.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Material vegetal y condiciones de crecimiento

#### 4.1.1 Cultivo *in vitro*

Para el cultivo *in vitro* se usaron cladodios jóvenes de aproximadamente 5 cm de largo de *Opuntia violacea*, *Opuntia ficus-indica*, *Opuntia robusta* y *Opuntia phaeacantha*. Se removieron las espinas de los cladodios y se lavaron con agua por dos horas, después se desinfectaron 1 min por inmersión en etanol al 70% seguido de una inmersión en hipoclorito de sodio al 2% por 25 min, los tejidos desinfectados se enjuagaron cuatro veces con agua destilada y esterilizada. Los explantes (areolas) se colocaron individualmente en recipientes de cultivo, con 30 ml de medio Murashige y Skoog (MS) complementado con 10 µl/l de PPM (Plant Preservative Mixture, Phytotech Labs) y 1 mg/l de benciladenina (BA) y fueron colocados en la cámara de incubación, desechándose a los 10 días los tejidos contaminados y con necrosis. La formación de brotes se observó entre las 8 y 12 semanas posteriores al cultivo de los explantes. Para promover su enraizamiento, los brotes de cada especie se colocaron en medio MS suplementado con 2 g/l de carbón activado. Una vez formado su sistema radical, las plántulas se transfirieron a suelo.

Por otro lado el Dr. Eugenio Pérez Molphe Balch de la Universidad Autónoma de Aguascalientes nos donó brotes de *Opuntia amyaclea*, *Opuntia ficus-indica* A, *Opuntia ficus-indica* B, *Opuntia macrocentra*, *Opuntia robusta* y *Opuntia streptacantha*. Estos brotes fueron propagados en nuestro laboratorio. La concentración de BA empleada en el medio MS para cada especie de *Opuntia* se muestra en la Tabla 1. Para enraizar los brotes de cada especie se colocaron en



medio MS suplementado con 2 g/l de carbón activado. Finalmente fueron transferidos a tierra.

**Tabla 1.** Concentración de benciladenina empleada en cultivo *in vitro*

Especie	BA mg/l
<i>Opuntia amyclea</i>	1.0
<i>Opuntia ficus-indica</i> A	1.0
<i>Opuntia ficus-indica</i> B	2.0
<i>Opuntia macrocentra</i>	0.5
<i>Opuntia robusta</i>	2.0
<i>Opuntia streptacantha</i>	2.0

#### 4.1.2 Germinación de semillas

Las semillas se obtuvieron de tunas de *Opuntia streptacantha*. Esta planta crece en la región semiárida de Villa de Zaragoza en el estado de San Luis Potosí, México. Los cladodios maduros de esta planta fueron herborizados y depositados en el herbario de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Las semillas se lavaron y se secaron en mantas de cielo durante 24 horas. Posteriormente se almacenaron durante 6 meses a 25° C y al final de este periodo las semillas se colocaron en una cámara de crecimiento a 25° C bajo el siguiente fotoperiodo: 12 horas luz ( $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) y 12 horas de oscuridad. Antes de iniciar con el tratamiento salino las plantas fueron transferidas a semihidroponía utilizando la solución nutritiva de Hoagland durante 1 semana para permitir su adaptación. Para el caso del estrés por sequía y calor las plantas fueron transferidas a tierra.

#### 4.2 Medios de cultivo para plantas

##### 4.2.1 Medio de Murashige y Skoog (MS)

Para el cultivo de plantas *in vitro* se empleó el medio de Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962). El medio de cultivo se prepara como se describe en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Medio de Murashige y Skoog

Solución	Componente	mg/L
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650
	KNO <sub>3</sub>	1900
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170
B	CaCl <sub>2</sub>	440
C	Na <sub>2</sub> EDTA	37.3
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27.8
D	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2
	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16.9
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8.6
E	KI	0.83
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.25
F	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0.025
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0.025
Vitaminas	Acido nicotínico	1.0
	Piridoxina-HCl	1.0
	Tiamina	10
	Myoinositol	100
Añadir 30 g/L de sacarosa. Ajustar el pH del medio a 5.7 con NaOH o HCl 0.1 N. Aforar a 1 L con agua destilada. Añadir 10 g/L de agar. Esterilizar los medios a 15 lb/pulgada <sup>2</sup> durante 15 min.		

#### 4.2.2 Medio de Hoagland

Para el cultivo de plantas en semihidroponia se empleó la solución nutritiva Hoagland 0.5X (Hoagland y Arnon, 1950) con una modificación en la concentración de hierro. La solución stock de Hoagland se prepara 1X como se describe en la Tabla 3.

**Tabla 3.** Solución de Hoagland 1X

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

\* Micronutrientes: 1 L de solución stock contiene:  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (2.86 mg),  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (1.81 mg),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.22 mg),  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.08 mg),  $\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.02 mg).

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

### **4.3 Tratamientos de estrés o ácido abscísico**

#### **4.3.1 Estrés por sequía y calor**

Para el tratamiento de sequía y estrés por calor se usaron plantas jóvenes de nueve semanas de edad de *Opuntia streptacantha* obtenidas a partir de semilla. El estrés por calor y sequía fue aplicado aumentando la temperatura en la cámara de crecimiento a 40° C y sin añadir agua a las plantas durante 13 días. Al mismo tiempo se mantuvieron plantas regadas cada tercer día y mantenidas a 25° C durante 13 días. Los cladodios de las plantas en estrés y de las plantas control

fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados a  $-70^{\circ}$  C hasta la extracción de RNA total y la cuantificación de prolina.

#### **4.3.2 Estrés salino**

Para el tratamiento de salinidad se usaron plantas jóvenes de nueve semanas de edad de *Opuntia streptacantha* obtenidas a partir de semilla en condiciones de semihidroponia. Se añadió solución de Hoagland con 0, 75, 150, 250 y 350 mM de NaCl a las plantas durante 11 días. Los cladodios fueron congelados en nitrógeno líquido a los 6, 9 y 11 días de tratamiento y almacenados a  $-70^{\circ}$  C para después realizar la extracción de RNA y la cuantificación de prolina y clorofila total.

#### **4.3.3 Tratamiento con ácido abscísico**

Para el tratamiento con ácido abscísico se usaron plantas de doce semanas de edad en condiciones de semihidroponia. La solución de Hoagland con 0, 0.1 y 100  $\mu$ M de ácido abscísico se añadió a las plantas en condiciones de luz durante 1.5 horas. Después del tratamiento los cladodios fueron congelados en nitrógeno líquido y almacenados a  $-70^{\circ}$  C para realizar la extracción de RNA.

#### **4.4 Análisis morfológicos**

Para cada grupo de plantas en estrés salino, la longitud y espesor del cladodio y la longitud de la raíz fueron medidos con un vernier a los 0, 6, 9 y 11 días de tratamiento en todas las concentraciones de NaCl empleadas. Las medidas de las plantas control en centímetros fueron consideradas como el 100%. Para determinar el porcentaje de la longitud y espesor del cladodio y la longitud de la raíz de las plantas bajo estrés salino usamos la siguiente formula: % de longitud o

grosor del cladodio o longitud de la raíz = (cm planta en estrés / cm planta control) x 100%.

## **4.5 Análisis bioquímicos**

### **4.5.1 Determinación de prolina**

El contenido de prolina libre fue extraído hirviendo 0.5 g de material vegetal en 2 ml de agua destilada. A 500 µl del extracto vegetal se añadieron 500 µl de citrato de sodio (pH 4.6) 0.2 mM y 2 ml de ninhidrina al 1% (ácido acético/agua, 60/40, v/v). La mezcla fue hervida durante 1 hora, para la extracción se añadieron 2 ml de tolueno. El contenido de prolina fue medido espectrofotométricamente (Beckman Du-530, Fullerton, USA) a 520 nm. Para generar el estándar se empleó el método de la ninhidrina descrito por Magne y Larher (1992) empleando prolina pura (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Todos los experimentos fueron realizados por triplicado usando cladodios de tres diferentes plantas. Los datos representan la media y su desviación estándar.

### **4.5.2 Determinación de clorofila**

El contenido de clorofila fue determinado como fue descrito por Arnon (1949). El pigmento fotosintético fue extraído en acetona fría al 80% y la absorbancia del extracto fue medida espectrofotométricamente (Beckman Du-530, Fullerton, USA) a 645 y 663 nm. Todos los experimentos fueron realizados por triplicado usando cladodios de tres diferentes plantas. Los datos representan la media y su desviación estándar.

### **4.5.3 Determinación de actividad enzimática de la delta 1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS)**

La actividad de la P5CS fue determinada mediante el método descrito por Hayzer y Leisinger (1980). Los extractos para medir la actividad de la P5CS fueron obtenidos de la siguiente manera: en un cuarto frío los cladodios fueron homogenizados en un amortiguador de extracción (pH 7.5, Tris-HCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, EDTA 1 mM, β-mercaptoetanol 10 mM, DTT 4 mM, PMSF 2 mM y PVPP 2%) en tubos Eppendorf previamente enfriados. Los extractos fueron centrifugados a 10, 000 x g durante 20 min a 4° C. Después los sobrenadantes fueron clarificados por centrifugación a 10, 000 x g durante 20 min a 4° C. La actividad enzimática de la P5CS fue determinada en el extracto enzimático como γ-glutamil cinasa monitoreando la formación de γ-glutamil hidroxamato. El ensayo enzimático fue realizado en una mezcla que contenía los siguientes reactivos en un volumen final de 0.5 ml: Tris-HCl 50 mM (pH 7.0), L-glutamato 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 20 mM, hidroxilamina HCl 100 mM, ATP 10 mM y el extracto enzimático. La mezcla de reacción fue incubada a 37° C durante 15 min y posteriormente la reacción se detuvo añadiendo 1 ml del amortiguador (2.5 g de FeCl<sub>3</sub> y 6 g de ácido tricloroacético en un volumen final de 100 ml de HCl 2.5 N). Las proteínas precipitadas fueron removidas por centrifugación y la absorbancia fue leída a 535 nm contra un blanco idéntico sin ATP. La cantidad del complejo γ-glutamil hidroxamato producido fue estimada con el coeficiente de extinción molar 250 mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> reportado para el complejo de Fe<sup>3+</sup> hidroxamato. La actividad fue expresada en U μg<sup>-1</sup> de proteína, lo que representa la cantidad de enzima requerida para producir 1 μmol de γ-glutamil hidroxamato minuto<sup>-1</sup>.

#### **4.5.4 Cuantificación de proteínas**

La concentración total de proteínas se determinó empleando el método de Bradford (1976) usando albúmina sérica bovina como estándar.

#### **4.6 Análisis de biología molecular**

##### **4.6.1 Técnicas de aislamiento de ácidos nucleicos**

###### **4.6.1.1 Extracción de ADN de *Opuntia streptacantha***

El ADN genómico fue obtenido de cladodios de *Opuntia streptacantha* mediante el método comercial DNeasy Plant Mini Kit de acuerdo a las especificaciones del fabricante (Qiagen, Hilden Germany).

###### **4.6.1.2 Extracción de ARN total de *Opuntia streptacantha***

El RNA total de cladodios de *Opuntia streptacantha* fue extraído mediante el método comercial RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden Germany) para los análisis de RT-PCR, mientras que para la construcción de la genoteca sustractiva el RNA total fue extraído mediante el método comercial RNAqueous (Ambion, USA) de acuerdo a las especificaciones de cada fabricante.

###### **4.6.1.3 Extracción de ADN plasmídico**

El ADN plasmídico fue obtenido mediante el método de Birnboim y Doly modificado (Kotchoni y col., 2003).

##### **4.6.2 Técnicas de amplificación y aislamiento de genes específicos de *Opuntia streptacantha***

###### **4.6.2.1 Síntesis de ADN complementario (cADN)**

La síntesis de primer cadena de cADN fue realizada en un volumen total de 30 µl mediante el sistema: First-Strand Synthesis System (RT-PCR; Invitrogen,

Carlsbad, USA). Cada mezcla de reacción contenía 1 µg de ARN total obtenido de cladodios de *Opuntia streptacantha* y digerido con la enzima DNAsa I (Invitrogen, USA) durante 15 min a temperatura ambiente eliminando así el ADN genómico presente, 0.3 mM de la mezcla de dNTP, 0.5 µg de oligo(dT)<sub>12-18</sub>, Tris-HCl 20 mM (pH 8.4), KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, ditioneitol (DTT) 0.01 mM, 40 U de inhibidor de ribonucleasa recombinante (RNaseOUT™) y 50 U de SuperScript™ II RT. Las mezclas de reacción fueron incubadas a 42° C por 50 min, después a 70° C por 15 min y finalmente con 1 U de RNasa H de *E. coli* a 37° C durante 20 min para remover el RNA de las moléculas híbridas cDNA: RNA. Simultáneamente se realizó una reacción control para cada muestra sin transcriptasa reversa para verificar la ausencia de ADN genómico.

#### **4.6.2.2 Clonación de los fragmentos *Osactina-1*, *Osp5cs* y *Osef-1* de *Opuntia streptacantha***

Para amplificar un fragmento del ORF de la delta 1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa (*p5cs*) los oligonucleótidos se diseñaron con base en las secuencias altamente conservadas de la 1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa de plantas. Para amplificar un fragmento del ORF de la *actina-1* (GenBank No. de acceso J01238) se usaron los oligonucleótidos reportados por Rodríguez-Kessler y col. (2006), y finalmente para amplificar un fragmento del ORF del factor de elongación *ef-1*, para ser usado como control de carga en los análisis de RT-PCR semicuantitativa, se usaron oligonucleótidos diseñados por nuestro grupo de trabajo. Los pares de oligonucleótidos diseñados para amplificar cada fragmento mediante RT-PCR se muestran en la Tabla 4.



**Tabla 4.** Oligonucleótidos diseñados para el aislamiento de genes de nopal

Gen	Oligonucleótidos diseñados		Tamaño del fragmento esperado (pb)
<i>Osactina-1</i>	Actina-1 sentido	5'-AACTGGGATGACATGGAGAA-3'	630
	Actina-1 antisentido	5'-ATCACACTTCATGATGGAGTTGTA-3'	
<i>Osp5cs</i>	p5cs-71 sentido	5'-CTTGATGGGAAAGCATGTGC-3'	1401
	p5cs-72 antisentido	5'-CCTCGAGCATGAATCCTACTT-3'	
	p5cs-73 antisentido	5'-GTGTACAAGAAGTGTTCATAGC-3'	
<i>Osef-1</i>	ef-1 sentido	5'-GCAAATTGACAGCAATGTGAG-3'	1130
	ef-1 antisentido	5'-TGGACATGTCGACTCTGGAAA-3'	

Los oligonucleótidos (externos o internos) para la amplificación del fragmento del gen *p5cs* fueron diseñados en las regiones conservadas de los cADNs de: *Mesembryanthemum crystallinum* (GenBank no. O65361), *Suaeda salsa* (GenBank no. AAM28630), *Vitis vinifera* (GenBank no. CAB40834), *Glycine max* (GenBank no. AAR86688) y *Medicago sativa* (GenBank no. CAA67069). Las reacciones anidadas de PCR para la amplificación del fragmento del gen *Osp5cs* fueron iniciadas con los oligonucleótidos externos 71 y 72 seguido por otra amplificación usando el oligonucleótido externo 71 y el oligonucleótido interno 73. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). Las amplificaciones de PCR fueron realizadas en un volumen de reacción de 50 µl. La mezcla de reacción contenía 1 µl de cADN como molde obtenido por transcripción reversa a partir de RNA aislado de cladodio de *Opuntia streptacantha* además de Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTPs 125 µM, 0.2 µM de cada oligonucleótido y 2.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, USA). Las condiciones de amplificación de

la PCR para el gen de la *actina-1* fueron: 5 min a 94° C seguido de 30 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 57° C y 60 s a 72° C, seguido de una extensión final a 72° C durante 7 min. Por otro lado, las condiciones de amplificación para el gen *Osp5cs* las condiciones fueron: 5 min a 94° C seguido de 30 ciclos de 30 s a 94° C, 60 s a 58° C (PCR anidado 1) y 59° C (PCR anidado 2) y 120 s a 72° C, seguido de una extensión final a 72° C durante 7 min. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%.

#### **4.6.2.3 Clonación de los fragmentos *Ostpdpk $\alpha$ 0*, *Ostpdpk $\alpha$ 1* y *Ostpdpk $\alpha$ 2* de *Opuntia streptacantha***

Los pares de oligonucleótidos para amplificar el fragmento de la subunidad alfa de la fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato (*Ostpdpk $\alpha$ 0*) a partir de ADN genómico aislado de cladodios de *Opuntia streptacantha* y los fragmentos *Ostpdpk $\alpha$ 1* y *Ostpdpk $\alpha$ 2* a partir de cADN de cladodios de *Opuntia streptacantha* bajo estrés por calor y sequía fueron diseñados con base en el uni-gen veintisiete de la genoteca sustractiva. Los oligonucleótidos fueron: sentido 5'-AGGCATCACATGTTGCATTG-3' y antisentido 5'-ACAAGATGTGCCAGTAGCT-3'. Las amplificaciones de PCR fueron realizadas en un volumen de reacción de 50  $\mu$ l que contenía 1  $\mu$ l de ADN genómico o cADN obtenido por transcripción reversa usando ARN aislado de cladodios en estrés por calor y sequía, Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTPs 125  $\mu$ M, 0.2  $\mu$ M de cada oligonucleótido y 2.5 U de taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, USA). Las condiciones de amplificación para el gen *Ostpdpk $\alpha$ 0* fueron: 5 min a 94° C seguido de 33 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 58° C y finalmente 90 s a 72° C, seguido por

72° C durante 7 min. Por otra parte, las condiciones para la amplificación de los genes *Ostpdpk $\alpha$ 1* y *Ostpdpk $\alpha$ 2* fueron las siguientes: 5 min a 94° C seguido de 33 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 58° C y finalmente 120 s a 72° C, seguido de una extensión final a 72° C durante 7 min. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%.

#### **4.6.2.4 Clonación de los cDNAs *Ostsui1 A* y *Ostsui1 B* de *Opuntia streptacantha***

Para aislar el cADN del factor de iniciación de la traducción (*sui1*), diseñamos el siguiente par de oligonucleótidos en el uni-gen trece: sentido 5'-TTATGTGCACATCCGTGTAC-3' y antisentido 5'-ACAATGCCAGCCTGAAC-3'. También usamos los oligonucleótidos sentido y antisentido M13 que corresponden al borde del vector pDNR-LIB de la biblioteca Creator™ SMART™ cDNA Library Construction kit. Las amplificaciones de PCR fueron realizadas en un volumen de reacción de 50  $\mu$ l con 1  $\mu$ l del producto de clonación como molde, el cual contenía todos los cADNs de *Opuntia streptacantha* obtenidos mediante la biblioteca Creator™ SMART™ cDNA Library Construction kit (Clontech, Palo Alto, CA); Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTPs 125  $\mu$ M, 0.2  $\mu$ M de cada oligonucleótido y 2.5 U de taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, USA). Las condiciones de amplificación de PCR fueron: 5 min a 94° C seguido de 30 ciclos de 60 s a 94° C, 60 s a 68° C y finalmente 90 s a 72° C, seguido de 72° C por 7 min. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8%.

#### **4.6.3 Genoteca sustractiva**

Los cADNs de doble cadena fueron sintetizados mediante el método SMART-PCR cDNA synthesis (Clontech, Palo Alto, CA) a partir de 1 µg de ARN total de cladodios no estresados y de cladodios en estrés por calor y sequía colectados a los 13 días de tratamiento. La genoteca sustractiva de cADN fue obtenida usando el método PCR-Select cDNA Subtraction kit (Clontech, Palo Alto, CA) de acuerdo al protocolo estándar del fabricante. Para ello se usó el cADN-SMART obtenido a partir de cladodios no estresados (driver) y de cladodios en estrés por calor y sequía (tester). El cADN-SMART problema fue sustraído dos veces del cADN-SMART control.

#### **4.6.4 Plásmidos**

El plásmido bacteriano autoreplicativo empleado para la clonación de los genes aislados en este trabajo mediante RT-PCR o mediante la genoteca sustractiva fue pCR4-TOPO (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Carlsbad, USA) que posee un tamaño de 3.9 kb.

#### **4.6.5 Transformación de *Escherichia coli***

Se emplearon células químicamente competentes y electrocompetentes de *E. coli* para la transformación. Se emplearon los métodos de transformación de choque térmico (Invitrogen, Carlsbad, USA) y electroporación (BTX, USA) de acuerdo a las especificaciones de cada fabricante.

#### **4.6.6 Secuenciación de ADN**

La secuenciación de los fragmentos de ADN obtenidos en este trabajo mediante RT-PCR ó mediante la genoteca sustractiva, fue realizada empleando el secuenciador automático ABI PRISM 377 (Perkin Elmer) en el Laboratorio Nacional de Genómica del Cinvestav, Unidad Irapuato.

#### **4.6.7 Análisis de RT-PCR de los genes obtenidos en la genoteca sustractiva**

Para amplificar cada fragmento mediante RT-PCR se diseñaron oligonucleótidos específicos a partir de la secuencia de cADN de los uni-genes obtenidos en la genoteca sustractiva (Tabla 5). Cada par de oligonucleótidos específicos para cada uni-gen amplificó un fragmento del tamaño esperado (Tabla 5). Las amplificaciones de PCR fueron realizadas en un volumen de reacción de 50 µl. Cada reacción contenía 1 µl de cADN obtenido por transcripción reversa usando ARN aislado de cladodios de *Opuntia streptacantha* sometidos a estrés por calor y sequía, tris-HCl (pH 8.4) 20 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTPs 125 µM, 0.2 µM de cada oligonucleótido y 2.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, USA). Las reacciones de PCR se realizaron como sigue: desnaturalización inicial a 94° C durante 5 min, dependiendo del uni-gen el número de ciclos fue de 21-35 y las condiciones fueron: 94° C (30 s), 55-64° C (30 s) y 72° C (120 s) y extensión final a 72° C durante 7 min. La amplificación para cada uni-gen fue realizada con diferente número de ciclos para asegurar un comportamiento lineal en las reacciones de PCR. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, excepto para el fragmento que codifica a la subunidad alfa de la fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato que fue analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 2.0%.

**Tabla 5.** Oligonucleótidos diseñados para análisis de RT-PCR

Gen	Oligonucleótidos diseñados	Tamaño del fragmento esperado (pb)
putative systemin receptor SR160	s 5'-GTAACAGAACTAGATCTCTCGG-3'	573
	as 5'-TAATGTTCCCTGTCCGTCCTGAA-3'	
putative phosphatase 2A inhibitor	s 5'- GAAGATACAAAGCTTACCAAGAC-3'	265
	as 5'-CATTGTTGAAGTAGGTGAGTG-3'	
adp-ribosylation factor	s 5'-ACTGGACTGGCTCTCAAAC-3'	254
	as 5'-CGAAACTCCATAAACTCAACTACA-3'	
ethylene-responsive transcriptional coactivator-like protein	s 5'-CGGTTGTGCTTCACAAATCGA-3'	306
	as 5'-CATACTCCTGAACAACCTGAG-3'	
homeobox 2 protein	s 5'-CAACTATTAGCTGCTCATGTTGC-3'	358
	as 5'-GGTACTCTAACTGCATGTCATC-3'	
lipid transfer protein	s 5'- ATGGCTAGCTCAACTTCCTTCAAG-3'	347
	as 5'-TTGGAGCAGTCGACGCTCAT-3'	
glutathione s-transferase	s 5'-CCTGAATTCCTCAAACCTCCAG-3'	323
	as 5'-CCATCATAGACATCGAGCAC-3'	
dehydroascorbate reductase	s 5'- GTACATGCAGTTGCTGTTCTC-3'	359
	as 5'-CCATATGATTATCCACCAGCC-3'	
delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	s 5'- GACTTGATGATGTAATTGACCTTGTC-3'	159
	as 5'-CAATGCGCCTTGCCATATCCATG-3'	
putative NADH-dependent hydroxypyruvate reductase	s 5'-ATTGGAGACAAGTGTGATGGAG-3'	390
	as 5'-GAATCCTTCAACCATCATTCTCG-3'	
type III chlorophyll a/b binding protein	s 5'-GTGTTTCAAATGGCTCTCATG-3'	343
	as 5'-TGAGGCTAGTCAAGATGTTG-3'	
carbonic anhydrase	s 5'-GAAAGCGTATGAGGAAGC-3'	476
	as 5'-CATCATCAGGGATGGACAT-3'	
sui 1 protein	s 5'- TTATGTGCACATCCGTGTAC-3'	222
	as 5'-ACAATGCCAGCCTGAAC-3'	
s-adenosylmethionine synthetase	s 5'-GAAGTGTACCTTGATGAGAAG-3'	448
	as 5'-AGTGACCATATGCAGCTGT-3'	
putative carboxyphosphoenolpyruvate mutase	s 5'-GACTTCAGTAGCCAAACATGCC-3'	274
	as 5'-ACAAATTCTACGAGCAACTTCGGTC-3'	

alkaline alpha-galactosidase seed imbibition protein	s 5'-GGTAATGGAGGAAGAGTTAG-3'	272
	as 5'-ACGCTATGAAACATATCCCCA-3'	
putative dolichyldiphospho-oligosaccharide protein	s 5'-GATGGCCTCGTCATCTTCGCT-3'	310
	as 5'-GGCAGGTACTGGAGCCTCAATT-3'	
Hydrolase	s 5'-ATTGCAAGTGCTGTTCTCGT-3'	355
	as 5'-AGTAGCAAGACATCCAAGATTG-3'	
pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit	s 5'-AGGCATCACATGTTGCATTG-3'	406
	as 5'-ACAAGATGTGCCAGTAGCT-3'	
2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	s 5'-GTGGCATCACCTTCAATGTG-3'	491
	as 5'-AATGAGTGTTGGCTCGTAGTC-3'	
fructose-biphosphate aldolase	s 5'-CGTGCCTTGCAGAGAACTGTT-3'	319
	as 5'-AGTCCTTGACATGAAGACTCTC-3'	
f-box protein	s 5'- CAAGATAAACCACAGCTTGA-3'	484
	as 5'-TCTGACAATAGTAGAGACCA-3'	
unknown protein (unigen 77)	s 5'-GAGCTTACGAAGAGAACTGTGA-3'	304
	as 5'-GACATTCCAGTGTTCCACATG-3'	
unknown protein (unigen 79)	s 5'-GAATGAAGCAGTTGATACGGCG-3'	431
	as 5'-AATGTGCTCGTCGGACGAGAA-3'	
unknown protein (unigen 82)	s 5'-GAGAAGCAAGTTATGATATTCGG-3'	298
	as 5'-CTATGATTTCCACAGAGACATG-3'	
unknown protein (unigen 88)	s 5'-AATGGCTGCGACTTATGCTGG-3'	296
	as 5'-CAGTGGACTTGTCTCGACTTTATC-3'	

#### 4.7 Análisis bioinformáticos

Las secuencias de ADN y proteína fueron analizadas con el programa DNASTAR (DNASTAR's Lasergene 7.1 Sequence Analysis Software; Madison, WI). Para obtener el número de ESTs, contigs y uni-genes las secuencias fueron analizadas con el programa seqman del DNASTAR (DNASTAR's Lasergene 7.1 Sequence Analysis Software; Madison, WI). La homología de los genes obtenidos en este trabajo fue analizada con el programa Blast (BLASTX) del NCBI (National Center

for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.org>). Las comparaciones y alineamientos de las secuencias de proteínas se realizaron con el programa ClustalW de la base de datos EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>). Los árboles filogenéticos fueron obtenidos con el programa MEGA 3.1 (Kumar y col., 2004) y MEGA 4 (Tamura y col., 2007). Los fragmentos de los ORFs y los ESTs obtenidos en este trabajo fueron incorporados a la base de datos del NCBI.



## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Identificación de genes inducidos en estrés hídrico y calor en nopal.

Se realizó una genoteca sustractiva para identificar los genes inducidos en el nopal durante estrés hídrico y estrés por calor, para lo cual mARN obtenido de cladodios de *Opuntia streptacantha* en estrés hídrico y calor (40° C) se empleó como “tester” y el mARN obtenido de cladodios de *Opuntia streptacantha* en condiciones control (riego y 25° C) como “driver”. En esta biblioteca obtuvimos 122 uni-genes a partir de 350 colonias seleccionadas al azar. Los uni-genes fueron clasificados de acuerdo a su función mediante la base de datos “gene ontology” en las siguientes categorías: (1) señalización, (2) factores de transcripción, (3) transporte, (4) metabolismo, (5) mantenimiento celular y desarrollo, (6) asociados a cloroplasto y fotosíntesis, (7) fotorrespiración, (8) estrés, (9) otros y (10) proteínas no clasificadas. Mediante análisis de RT-PCR se confirmó la expresión diferencial de 26 uni-genes; por ejemplo, la enzima clave que participa en la síntesis de prolina: delta-1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa y proteínas que participan en el proceso de fotosíntesis. De manera interesante en el análisis de RT-PCR de la subunidad alfa de la fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato se observó la aparición de un segundo transcrito sobre-expresado en condiciones de estrés hídrico y calor. Al comparar las dos secuencias obtenidas con la región genómica confirmamos que el transcrito de mayor tamaño presenta una retención de intrón. Por otro lado obtuvimos la secuencia completa del cDNA de dos isoformas del factor de iniciación de la traducción (*sui1*) mediante PCR inverso de

una genoteca de cDNA completa de nopal, utilizando la información del EST de *sui1*. Además demostramos que el gen *sui1* es diferencialmente expresado en diversas condiciones de estrés abiótico. Los genes aislados en este trabajo proporcionan un mayor conocimiento de los mecanismos de tolerancia al estrés hídrico y temperaturas extremas. Por otro lado el análisis en mutantes insercionales de *A. thaliana* de los genes que son desconocidos podría generar información sobre su posible función en el estrés hídrico y calor.

Concise title:

Cactus pear genes expressed under stress

Informative title:

Identification of water and heat stress induced genes in cactus pear

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

## **Abstract**

Abiotic stress conditions, such as drought and heat, produce extensive losses to agricultural production worldwide. *Opuntia* spp. has become important in the semiarid areas of México. As a crassulacean acid metabolism plant, this plant is characterized by high water use efficiency. Because of this and its tolerance to drought, this plant can adapt to a variety of climatic conditions. In order to identify genes induced during the water and heat stress response in cactus pear, suppression subtractive hybridization (SSH) was performed by using cDNA prepared from cladodes of *Opuntia streptacantha* young plants grown for 13 days under restricted water supply and high temperature (40° C) as tester and cDNA from unstressed cladodes of *Opuntia streptacantha* young plants as driver. A forward subtractive cDNA library was constructed and 122 uni-genes were generated from 350 randomly picked clones. The putative functions of uni-genes were predicted by BLASTX. Differentially expressed genes were classified into 10 functional categories according to their putative functions generated by the gene ontology database. RT-PCR analysis was performed to confirm that 26 uni-genes are differentially expressed in *Opuntia streptacantha* under water and heat stress. Furthermore *sui1*, one of the identified uni-genes, was up-regulated by the combination of different abiotic stress conditions like salt, cold, heat and water stress. To our knowledge, these ESTs are the first cDNA sequences involved in the response to stress in this important crassulacean acid metabolism cactus pear reported so far.

**Keywords:** *Opuntia streptacantha*, SSH, stress-induced transcripts, water and heat stress.

**Abbreviations:** ESTs, expressed sequence tags; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; SSH, suppression subtractive hybridization.

## 1. Introduction

Due to increasing carbon dioxide concentrations an augment in climate variability has occurred and has triggered extreme climate events like floods, drought and heat wave. Projections using the Special Report on Emissions Scenarios in a range of climate models result in an increase in global average surface temperature from 1.4 to 5.8° C over the period 1990 to 2100. The annual precipitation is projected to increase or decrease, depending on regions, by 5 to 20% compared with the past 30-year mean (IPCC, 2007a, b). Abiotic stress conditions, such as drought and heat, produce extensive losses to agricultural production worldwide (Boyer, 1982; Rosegrant and Cline, 2003).

Drought and heat stress cause a metabolic decrease of photosynthesis (Salvucci and Crafts-Brandner, 2004), the production of reactive oxygen species (Larkindale and Knight, 2002), and produces increased levels of hormones such as abscisic acid (ABA) (Xiong et al., 2002). Drought causes stomatal closure, osmotic stress, and leaf growth inhibition. Heat stress affects membrane fluidity and permeability (Alfonso et al., 2001; Sangwan et al., 2002) and causes inhibition of the processes related to carbon assimilation like transpiration and respiration (Stone, 2001).

Various genes and metabolites are involved in water stress response in plants. The products of the stress-inducible genes and metabolites have been classified into two groups. The first group includes proteins that probably function in stress tolerance, such as late embryogenesis abundant proteins, heat shock proteins, aquaporins, enzymatic antioxidants, various proteases, proline transporters, and metabolites such as osmolytes and sugar. The second group

includes protein involved in the regulation of signal transduction and gene expression that probably function in stress response such as protein kinases, phosphatases, enzymes in phospholipid metabolism, calcium-binding proteins and transcription factors (Bartels and Sunkar, 2005).

The heat response involves several genes that codifies proteins that participates in signal transduction networks like heat stress transcription factors, and proteins that probably function in thermo-tolerance like heat-shock proteins (Dong-Yul et al., 2003).

Drought and heat tolerance of plants is a complex trait, most probably controlled by multiple genes. In the years to come we will see further incorporation of genomics techniques into the research on the stress response and its evolution, with the aims of identifying and analyzing genes involved in tolerant phenotypes (Bijlsma and Loeschcke, 2005). Understanding of the molecular mechanisms underlying the drought and heat stress tolerance will be helpful in the development of new strategies to improve the stress tolerance of agriculturally important plants (Xiong et al., 2002). *Opuntia* spp. has become important in the arid and semiarid areas of México, where it plays a strategic role in subsistence agriculture (Pimienta-Barrios, 1994). Cactus pear is edible as a fruit and vegetable, and it is also used for medicinal and cosmetic purposes, as forage, building material, and as a source of natural colors. The two major challenges for cactus pear in arid climates are temperature extremes and lack of available water. However, several adaptations allow them to cope with these difficulties. For example they have leaves reduced to spines, which lowers surface area, thick cuticle preventing direct water loss to the atmosphere and a succulent consistency favoring the adherence

of the water to complex carbohydrates called mucilage (Rebman and Pinkava, 2001). This plant has a specialized photosynthetic mechanism known as Crassulacean Acid Metabolism (CAM), whereby these plants open their stomates and take up CO<sub>2</sub> at night, when temperatures are lower and humidity higher than during the daytime. These mechanisms invariably results in reduced water loss (Nobel, 1995). Owing to its high water-use efficiency and its high drought-tolerance, this cactus is a valuable forage resource in arid and semiarid lands during periods of drought; therefore it has been cultivated in the arid and semiarid regions of many countries (Le Houréou, 1996). In the light of global desertification and declining water resources, *Opuntia* spp. is gaining even more importance as an effective food production system including both the vegetative but also the fruit parts. Thus, its importance and physiological adaptations make this genus an attractive model plant to elucidate the molecular mechanisms underlying the water deficit and heat tolerance.

PCR-selected cDNA subtraction, often referred to as suppression subtractive hybridization, is an efficient method widely used in the study of differential gene expression (Diatchenko et al., 1996; Zheng et al., 2004). The aim of the present study was to identify genes induced by water and heat stress in *O. streptacantha* young plants subjected to a combination of water and heat stress by means of construction of a subtractive cDNA library. Here we present the first report of *O. streptacantha* expressed sequence tags (ESTs).



## 2. Materials and methods

### 2.1 Plant material and growth conditions

Seeds were extracted from *Opuntia streptacantha* cactus pears collected in the semiarid region of Villa de Zaragoza in the state of San Luis Potosí, México. The seeds were washed and dried for 24 h. With the purpose to break the seed latency, they were stored during 6 months at 25° C (Romero-Schmidt et al., 1992). Then, they were placed in a seed germination bed in a growth chamber at 25° C under 12 h (150  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) light and 12 h dark cycle.

### 2.2 Water and heat stress treatments

Water and heat stress were applied to nine-week old *O. streptacantha* young plants by raising the temperature in the growth chamber to 40° C and by withdrawing water from plants for 13 days. At the same time well-watered plants were maintained at 25° C for 13 days. Water and heat-stressed cladodes and unstressed cladodes were harvested, immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -70° C until the total RNA isolation, and the estimation of proline and total chlorophyll content.

### 2.3 Combination of stress treatments

One-year old *O. streptacantha* were transferred to a perlite/sand support in semihydroponic conditions. ABA, salt and cold treatment was imposed by growing the plants at 4° C in Hoagland nutrient solution containing 100  $\mu\text{M}$  ABA and 250 mM NaCl during seventeen days. Other group of plants was subjected to 250 mM

NaCl and another group of plants was subjected to 4° C, while a fourth group was grown at 40° C and also stressed in 250 mM NaCl. Moreover one-year old *O. streptacantha* plants were subjected to recurrent cycles of 40° C during the day and 4° C during the night and to water stress withdrawing water from plants for seventeen days. Another one-year old *O. streptacantha* plants were grown under recurrent cycles of 40° C during the day and 4° C during the night and a final group of plants was subjected to water stress and 40° C. After treatments, cladodes were frozen in liquid nitrogen for subsequent total RNA isolation.

#### 2.4 Proline content

Free proline was extracted by boiling 0.5 g of plant material in 2 ml of distilled water. Then 500 µl of 0.2 mM sodium citrate (pH 4.6) and 2 ml of 1% ninhydrin (acetic acid/water, 60/40, v/v) were added to 0.5 µl of the plant extract. Mixture was boiled 1 h, 2 ml of toluene was added for the extraction. Proline content was measured spectrophotometrically (Beckman Du-530, Fullerton, USA) at 520 nm following the ninhydrin method described by Magne and Larher (1992), using pure proline (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) as the standard. All of the experiments were carried out in triplicates using cladodes from three different plants and the data represents the mean ± SD.

#### 2.5 Total RNA isolation

After collection of un-stressed and water and heat-stressed cladodes, the frozen cladodes were ground to a fine powder with a mortar and pestle. Total RNA for each treatment was extracted from cladodes using the RNAqueous Kit (Ambion,

USA) following the manufacturer instructions. Quality and concentration of RNA were checked on denaturing agarose gel and by absorbance measurements at 260 and 280 nm on a UV spectrophotometer.

## 2.6 Construction of subtracted cDNA library

Double strand cDNAs were synthesized using the SMART-PCR cDNA synthesis kit (Clontech, Palo Alto, CA) from 1 µg total RNA of un-stressed cladodes and water and heat-stressed cladodes collected 13 days after the treatment. The subtractive cDNA library was obtained using the PCR-Select cDNA Subtraction kit (Clontech, Palo Alto, CA) according to the standard protocol provided. SMART-cDNA of un-stressed cladodes (driver) and water and heat-stressed cladodes (tester) were used. The tester SMART-cDNA was subtracted twice by the driver SMART-cDNA (forward subtraction). The subtracted cDNA population was cloned into the pCR4-TOPO cloning kit (Invitrogen, Carlsbad, CA) and used to transform with One Shot TOP10F' chemically competent *Escherichia coli* cells (Invitrogen, Carlsbad, CA).

## 2.7 Sequencing and bioinformatics analysis of cDNA clones

Plasmids DNA from cDNA clones was extracted and partially sequenced with ABI PRISM 377 DNA automated sequencer (Perkin Elmer). Each sequence was screened for overall base quality and contaminating vector was removed. All the sequences were analyzed with the seqman DNASTar program to obtain the number of ESTs, contigs, and unigenes. The homology of the unigenes were analyzed with the Blast program (BLASTX) provided by the National Center for Biotechnology

Information (NCBI) website (<http://www.ncbi.org>). The ESTs were also submitted to the GenBank dbEST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>).

## 2.8 RT-PCR analysis

Specific primers to amplify each fragment by RT-PCR were designed from cDNA sequence of each uni-gene (Table 1). All uni-gene-specific primers amplified cDNA fragments with corresponding sizes predicted by the designed primer. In order to amplify an elongation factor EF-1 fragment (loading control) the primers used were 5-EF-1 sense 5'-GCAAACCTTGACAGCAATGTGAG-3' and 3-EF-1 antisense 5'-TGGACATGTCTGACTCTGGAAAA-3'. PCR amplifications were performed in a 50  $\mu$ L reaction mixture containing 1  $\mu$ L of the cDNA as template obtained by reverse transcription using RNA isolated from cladode, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 125  $\mu$ M dNTPs, 0.2  $\mu$ M each primer and 2.5 U Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA). Depending on the uni-gene, PCR reactions were subjected to 21-35 cycles at 94 °C (30 s), 55-64 °C (30 s) and 72 °C (120 s). Amplification was performed with different number of cycles to ensure a linear response in the PCR reaction. The samples were analyzed by electrophoresis on 0.8% agarose gels, except for fragment encoding pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit that was analyzed by electrophoresis on 2.0% agarose gel.

## 2.9 Cloning of two cDNA encoding translation initiation factor (sui1) A and B (*Ostsui1 A* and *Ostsui1 B*)

In order to isolate the cDNA of the translation initiation factor, we designed primers based on the unigen thirteen. The nucleotide sequences of the designed primers were as follows: sense 5-SUI1 5'-TTATGTGCACATCCGTGTAC-3' and antisense 3-SUI1 5'-ACAATGCCAGCCTGAAC-3'. Additionally, we used the M13 forward and reverse primers corresponding at the border of the pDNR-LIB vector of the Creator™ SMART™ cDNA Library Construction kit. PCR amplifications were performed in a 50 µl reaction mixture containing 1 µl of the cloning product as template which contains all cDNAs of *Opuntia streptacantha* obtained by Creator™ SMART™ cDNA Library Construction kit; 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 125 µM dNTPs, 0.2 µM each primer and 2.5 U taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA). The PCR amplification conditions were as follows: 5 min at 94 °C followed by 30 cycles of 60 s at 94 °C, 60 s at 68 °C and finally 90 s at 72 °C, followed by 72 °C for 7 min. The samples were analyzed by electrophoresis on 0.8% agarose gels. Polymerase chain reaction products of the expected size were cloned in the pCR4-TOPO vector (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Carlsbad, USA) and further sequenced with an ABI PRISM 377 DNA automated sequencer (Perkin-Elmer). Comparisons and protein sequence alignment were carried out using the ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) program.

2.10 Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit (*Ostpdpkα0*, *Ostpdpkα1* and *Ostpdpkα2*) fragments cloning and sequencing

The pair of primers to amplify the fragment *Ostpdpk $\alpha$ 0* from DNA genomic isolated from *O. streptacantha* cladodes with the DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), and the fragments *Ostpdpk $\alpha$ 1* and *Ostpdpk $\alpha$ 2* from cDNA from *O. streptacantha* cladodes under water and heat stress were designed based on the unigen twenty seven. The primers were: 5-*Ostpdpk $\alpha$*  sense 5'-AGGCATCACATGTTGCATTG-3' and 3- *Ostpdpk $\alpha$*  antisense 5'-ACAAGATGTGCCAGTAGCT-3'. PCR amplifications were performed in a 50  $\mu$ l reaction mixture containing 1  $\mu$ l of the DNA genomic or cDNA obtained by reverse transcription using RNA isolated from water and heat-stressed and un-stressed cladodes, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 125  $\mu$ M dNTPs, 0.2  $\mu$ M each primer and 2.5 U taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA). The PCR amplification conditions for *Ostpdpk $\alpha$ 0* gene were as follows: 5 min at 94° C followed by 33 cycles of 30 s at 94° C, 30 s at 58° C and finally 90 s at 72° C, followed by 72° C for 7 min, and for *Ostpdpk $\alpha$ 1* and *Ostpdpk $\alpha$ 2* genes were as follows: 5 min at 94° C followed by 33 cycles of 30 s at 94° C, 30 s at 58° C and finally 120 s at 72 °C, followed by 72 °C for 7 min.

The samples were analyzed by electrophoresis on 0.8% agarose gels. Polymerase chain reaction products of the expected size were cloned in the pCR4-TOPO vector (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Carlsbad, USA) and further sequenced with an ABI PRISM 377 DNA automated sequencer (Perkin-Elmer). Comparisons and nucleotide sequence alignment were carried out using the ClustalV (DNASTAR's Lasergene 7.1 Sequence Analysis Software).

### 3. Results

#### 3.1 Characterization of stress treatment

We subjected *Opuntia streptacantha* young plants to water and heat stress (40° C). As controls, we used well-watered plants that were not subjected to heat stress (25° C). Water and heat stress effects in *O. streptacantha* young plants were observed every day. After the first week of stress we observed a change of color in the cladodes from dark green to light green. At days 12 and 13 from stress initiation we observed a more remarkable change of coloration in the cladodes, so we collected cladodes samples from control and treated cladodes at these days for proline analysis. In a recent study realized by our group we observed a high proline accumulation in cladodes of *O. streptacantha* young plants under salt stress conditions (Silva-Ortega et al., 2008); to evaluate the participation of this osmolyte in water and heat stress we decide to measure it. Proline accumulation at day 12 in cladodes of stressed plants was of approximately 25-fold with regards to the control, while that the registered at day 13 was 110-fold in comparison with the control and 2-fold in comparison with the stressed plants at 12 days (Fig. 1). On the basis of these results, we decide to construct the EST library by suppression subtractive hybridization using the stressed cladodes collected at day 13.

#### 3.2 Identification of differentially expressed gene transcripts in *Opuntia streptacantha* by SSH

In order to identify genes differentially expressed in cactus pear under water and heat stress conditions, a subtracted cDNA library of *Opuntia streptacantha* young cladodes was developed. As defined for this method, “tester” is used to

designate the cDNA population containing sequences of interest and “driver” to designate the sample used to remove sequences from genes expressed in both populations. Total RNA from tester (water and heat stressed) and driver (unstressed) young cladodes were reverse-transcribed prior to PCR-select cDNA subtraction. The subtractive PCR product was ligated into T-easy vector, prior to transfer into *E. coli*, 350 colonies were picked at random from the plates and the DNA plasmid was isolated and digested with *EcoRI*. Digestion products were analyzed on agarosa gel in order to discarder fragments lowers than 100 bp and then the sequencing was realized.

A total of 350 ESTs were generated. After data assembly with the Seqman program of DNASTar, 133 contigs were formed with an average length of 400 bp. BLAST analysis of the 133 contigs using the GenBank blastx database produced 122 tentatively unique genes (Table 2), which were submitted to GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) with accession numbers from EX720493 to EX720614.

### 3.3 Functional classification of differentially expressed genes

To understand the molecular mechanisms of water and heat tolerance of *Opuntia* plants, differentially expressed genes selected by subtractions were classified into different categories according to their putative functions generated by the gene ontology (<http://www.geneontology.org/>) database. A total of 122 transcripts with hits to the GenBank blastx database were grouped into 10 categories: (1) signaling, (2) transcription factor, (3) transport, (4) metabolism, (5) cell maintenance and development, (6) chloroplast associated and photosynthesis, (7) photorespiration, (8) stress, (9) others and (10) unclassified proteins (Fig. 2).



The category with the highest percentage of genes with known function was related to metabolism; approximately 22% of the transcripts were included in this category. The majority of the genes related to stress already have been reported in other model plants as genes that play a very important role in the plants under abiotic stress conditions; 9% of the transcripts belong to this category. From approximately 39% of the transcripts within the unclassified proteins group, 46% are of unknown function and 54% did not show significant similarity.

#### 3.4 Analysis of water stress and heat-regulated differential gene expression by RT-PCR

To confirm that 26 unigenes represented differentially expressed genes under water and heat stress their expression was determined by RT-PCR analysis (Fig. 3). The genes that were analyzed belong to 8 of 10 categories. Several genes identified in this study were previously reported as induced during biotic and abiotic stress responses in various plants and thus potentially involved in plant defense responses. The conditions for PCR were optimized to produce unsaturated PCR product accumulation. For all unigenes analyzed, each signal was normalized to the elongation factor (eF1) signal (Fig. 3) using a standard number of PCR cycles depending of each gene (see materials and methods). As shown in *figure 3*, all analyzed unigenes increased in the tester condition (water and heat-stress plants) relative to the driver condition (unstressed plants). The ADP-ribosylation factor, homeobox 2 protein, lipid transfer protein, carbonic anhydrase, alkaline alpha-galactosidase seed imbibition protein, unknown protein (79) genes are examples of

each category that clearly showed enhanced transcript accumulation in water and heat stressed plants as compared with control plants.

### 3.5 Analysis of sequences of two genes obtained in SSH

#### 3.5.1 Isolation and sequence analysis of two cDNAs corresponding to a cactus pear SUI1 gene (*Ostsui1 A* and *Ostsui1 B*)

An unigen (EST) corresponding to an ORF fragment encoding a SUI1 protein was selected to obtain the full-length cDNA using a cDNA library of the same specie of cactus pear (Data not shown). The full-length cDNA was obtained by PCR (767 bp) using the 5-SUI1 and 3-SUI1 primers designed in the unigen-13 (233 bp), and the M13 forward and reverse primers that correspond at the border of the pDNR-LIB vector. Two PCR fragments (767 bp and 782 bp) were obtained and cloned. Then three clones of each fragment were sequenced. One of them corresponds to *Ostsui1 A*, and the other codifies for a new isoform of SUI1 protein that we named *Ostsui1 B*. The size of each cDNA was of 767 bp for *Ostsui1 A*, and of 782 bp for *Ostsui1 B*. The sequences obtained were registered at the GenBank (EU239956 and EU239957). *Ostsui1 A* have an ORF of 344 bp that codifies a protein of 113 aa, and *Ostsui1 B* have an ORF of 341 bp that codifies a protein of 112 aa. We compared the ORF of *O. streptacantha Ostsui1 A* and *Ostsui1 B* reported in this work using Clustal analysis (Fig. 4A). The identity between *Ostsui1 A* and *Ostsui1 B* was 71.4%. The highest identity of *O. streptacantha Ostsui1 A* was to *Populus trichocarpa* with 89.4% (GenBank accession no. ABK93182), *Coffea arabica* with 87.6% (GenBank accession no. CAD58629), *Solanum*

*tuberosum* with 87.6% (GenBank accession no. [DQ222518.1](#)) and *Pinus pinaster* with 86.7% (GenBank accession no. CAC84489). For *O. streptacantha Ostsui1 B* the highest identity was to *Vitis vinifera* with 86.6% (GenBank accession no. CAO38954), *Arabidopsis thaliana* with 79.5% (GenBank accession no. NP\_568818), *Pinus pinaster* with 75.9% (GenBank accession no. CAC84489) and *Sporobolus stapfianus* with 75.9% (GenBank accession no. Q9SM41). A phylogenetic tree of *sui1* from previous plant species was constructed using MEGA 4 version (Tamura et al., 2007) (Fig. 4B).

### 3.5.2 Analysis of differential expression of *Ostsui1* gene in different conditions of abiotic stress

To examine if *Ostsui1* gene is regulated in different conditions of abiotic stress, their expression was determined by RT-PCR analysis (Fig. 5). The conditions for PCR were optimized to produce unsaturated PCR product accumulation. Each signal was normalized to the actin signal (Fig. 5) using a standard number of PCR cycles (see materials and methods). The *Ostsui1* gene was down-regulated when the *O. streptacantha* plants were subjected to the following stress combinations: 100  $\mu$ M ABA, salt stress and cold (Fig. 5A) and by cold (Fig. 5B). However their expression was up-regulated by the combination of: cold, heat and water stress; cold and heat; heat and water stress (Fig. 5B); salt and heat stress and finally only by salt stress (Fig. 5A).

### 3.5.3 Cloning of a second cDNA fragment encoding pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit (*Ostpdpk $\alpha$ 2*)

Interestingly, in the RT-PCR analysis corresponding to pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit gene, two bands were observed, one of expected size and another one of highest length (Fig. 6A). In order to determine the identity of this transcript both RT-PCR products (436 and 485 bp) were cloned and sequenced. The first one, as expected, corresponded to *Ostpdpk $\alpha$*  (1) (Table 2, unigene 27) isolated in the subtracted cDNA library, and the second transcript *Ostpdpk $\alpha$*  (2) revealed that the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit have an intron retention. The new sequence was registered at the GenBank (no. X). To confirm that this sequence have an intron retention we isolate a genomic fragment with the primers used for the RT-PCR analyses, the *Ostpdpk $\alpha$*  (0) product of 1452 pb was cloned and sequenced. We compared the fragments of the *O. streptacantha* *Ostpdpk $\alpha$*  (0), *Ostpdpk $\alpha$*  (1) and *Ostpdpk $\alpha$*  (2) using *Clustal V* analyses (Fig. 6B, C).

#### 4. Discussion

Plants are subjected to a combination of environmental conditions in their natural habitat, nevertheless, little is known about the molecular mechanisms of the responses of plants to a combination of two different stresses (Rizhsky et al., 2004). Drought and heat stress represent an excellent example of two different abiotic stresses that occur in the field simultaneously, especially in arid or semi-arid areas (Mittler et al., 2001; Mittler, 2006). Because of its water tolerance characteristic, the genus *Opuntia* has been cultivated in the arid and semiarid regions of many countries, and it is an attractive model plant to elucidate the molecular mechanisms of drought and heat tolerance. Accordingly, the objective of this investigation was to isolate genes differentially expressed under water and heat stress in *Opuntia streptacantha*. In order to define the conditions to construct the cDNA library we evaluated the Pro content in cladodes of *O. streptacantha* subjected to water stress and heat. Environmental stresses such as low water availability, low and high temperature, and salt can induce the accumulation of one or several compatible solutes such as Pro, glycine betaine, polyols or sugars in plants (Delauney and Verma, 1993; Rhodes and Hanson, 1993). Particularly, in *O. streptacantha* subjected to 75, 150, 250 and 350 mM NaCl during 11 days, Pro accumulation increased gradually with rising concentration of NaCl and days of treatment (Silva-Ortega et al., 2008). In *O. ficus-indica*, a slight increase in the amount of Pro at 150 mM NaCl was observed in the basal and apical cladodes as well as in the roots (Franco-Salazar and Véliz, 2007). In *O. megacantha* cultivars exposed to heat stress (47° C), an increase in the Pro pool of approximately 2-fold with regard to the control was reported for one of several cultivars analyzed

(Flores-Hernández et al., 2001). Our results show that at day 13 the proline accumulation in cladodes of stressed plants was 110-fold in comparison with the control and 2-fold in comparison with the stressed plants at day 12. Our result suggests that the Pro increase might function as a compatible solute not only in *Opuntia* under salt stress like has been reported (Franco-Salazar and Véliz, 2007; Silva-Ortega et al., 2008) but also in water and heat stress.

The objective of this investigation in *Opuntia* functional genomic is the identification of genes involved in the stress responses. For this purpose, we generated a cDNA library using PCR-select cDNA subtraction with cDNA from *O. streptacantha* young cladodes subjected to water and heat-stress during 13 days as driver and that from unstressed young cladodes as tester. BLASTX analysis showed that approximately 78% of the unigenes obtained from the SSH had significant protein homology to genes from other plants, from which 18% are of unknown function. From the unclassified proteins group (40%), 46% are of unknown function and 54% did not show significant similarity. It will be important for future work to study the group of unigenes that did not show significant similarity. On the other hand the sequences 54% that did not showed any homology (Fig. 2) could correspond to UTR regions, as it suggests the presence of poli A tail in some of these sequences. Although the highest percentage of unigenes (40%) are grouped into the unclassified category, another important percentage belongs to the stress category with a 9% this category occupies the fourth place after chloroplast associated and photosynthesis category (13%) and metabolism category (23%). This result suggests that the cDNA library was successful because in addition to the genes involved in stress, the genes of others categories could be involved indirectly in the

response of the plant to water deficit and heat. Functional categories showed that the genes represented by those unigenes had a wide range of roles in different cell process, which suggested that cactus pear seedlings responds to drought and heat stress in a global level. On the other hand it will be interesting to analyze the genes that have not been previously implied in stress.

Stress perception and signaling pathways are critical components of adaptive response and are vital for the plant species to survive under extreme environmental constraints like drought, salt and extreme temperatures. A detailed knowledge of cascades of signal perception under abiotic stress response is lacking. Nevertheless several components of the signaling pathways in response to drought stress have been identified in the model plant *A. thaliana* (Seki et al., 2001). The systemin receptor SR160, phosphatase 2A inhibitor and ADP-ribosylation factor genes were classified in the signaling category. Results from our RT-PCR experiments clearly confirmed that these genes were up-regulated in *O. streptacantha* young plants under drought and heat stress (Fig. 3: 1, 2, 3). The systemin receptor has been identified as a plasma membrane-bound, leucine-rich repeat receptor kinase that participates in the plant systemic defense (Meindl et al., 1998; Scheer and Ryan, 1999). It interacts with the systemin, a peptide that is derived from a precursor called prosystemin, which is released from the wound site in response to attack by herbivorous insects, to trigger systematic wounding responses (Pearce et al., 1991; Scheer and Ryan, 1999; Scheer and Ryan, 2002). It has become increasingly evident that the underlying stress signaling pathways overlap and interact substantially. Although there is a remarkable specificity for stress signal perception, the signaling pathways and the resulting responses often

appear to be rather unspecific (Kovtun et al., 2000; Dombrowski, 2003). For example, it has been previously reported that UV-B radiation, an abiotic stress, activates components of the systemin signaling pathway (Yalamanchili and Stratmann, 2002), nevertheless it is unknown if this signaling pathway takes part in drought and heat stress. Systemin receptor SR160 gene induction in cactus pear under drought and heat stress suggest that the systemin signaling pathway could be activated in the response to this stress.

Transcription factors usually play important roles in signal transduction pathways and are one of the earliest groups of genes to respond to stress conditions (Shinozaki et al., 2003). Up to now, various transcription factors from several families were shown to be related to stress responses (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Liu et al., 1998; Kawasaki et al., 2001; Seki et al., 2002b; Bray, 2004; Maruyama et al., 2004). Transcription factors bind to cis-acting elements in the promoters of environmental stress responsive genes, or interact with other transcription factors, subsequently activating or repressing gene expression (Chen and Zhu, 2004). Two *Opuntia* up-regulated sequences matched with ethylene-responsive transcriptional coactivator-like protein and homeobox 2 protein. Ethylene-responsive factors (ERF) are a transcription factor family involved in regulating the defence response (Singh et al., 2002). The ERF family is unique to plants (Ohme-Takagi and Shinshi, 1995; Fujimoto et al., 2000; Mazarel et al., 2002; Tournier et al., 2003; Zhang et al., 2004; Cao et al., 2006). Some ERF proteins were found to interact not only with GCC-box but also with DRE/CRT, demonstrating that ERF proteins play roles in both biotic and abiotic stress responses (Park et al., 2001; Lee et al., 2004; Tang et al., 2006; Xu et al., 2007). For example the ethylene-responsive transcriptional



coactivator transcript was elevated in leaves of *A. thaliana* plants subjected to a combination of drought and heat stress (Rizhsky et al., 2004). With respect to homeobox is a conserved DNA motif that generally is associated with development. Each homeobox gene encodes a conserved 61 amino acid sequence known as the homeodomain present in transcription factors found in all the eukaryotic organisms (Gehring, 1987). Many homeobox-containing genes have been isolated from a wide variety of plants, including mono- and dicots and they have been classified into several families according to specific distinguishing features (Ariel et al., 2007). One of them is the knotted related homeobox (KNOX), family to which the homeobox 2 protein of *O. streptacantha* belongs. KNOX genes are differentially required for meristem development and function to inhibit cell expansion and differentiation associated with organogenesis (Scofield and Murray, 2006); however there are not reports about the participation of this family of homeobox proteins in response to stress.

The largest percentage of genes was assigned to the metabolism category. Changes in primary metabolism are a general response to stress in plants (Ingram and Bartels, 1996). As described in the results, a notable induction at transcriptional level of the SUI1 factor, S-adenosylmethionine-synthetase, carboxyphosphoenol-pyruvate mutase, alkaline alpha-galactosidase seed imbibition protein, dolichyldiphosphooligosaccharide protein, hydrolase, pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit, 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase and fructose-biphosphate aldolase was observed.

The initiation of protein synthesis is a conserved process in eukaryotic cells in which the initiator methionyl-tRNA and mRNA is bonded to the 40s ribosomal subunit, followed by the association to the 60s subunit to form the 80s initiation complex. This process requires the participation of several initiation factors like SUI1. Interestingly it has been shown that some translation initiation factors in cereals after a heat shock were increased (Gallie et al., 1998). By RT-PCR analysis we showed that *sui1* gene of *O. streptacantha* was induced by the combination of heat and other abiotic stresses such as salt, cold and heat (Fig. 5A and B) additionally confirming that this gene is up-regulated in heat and water stress. Sui1 was up-regulated by salt stress too (Fig. 5A). Transgenic *Arabidopsis* plants that express the eIF1A from *Beta vulgaris* exhibited increased tolerance to NaCl (Rausell et al., 2003). Up-regulation of translation initiation factor (*sui1*) gene suggests that the translational machinery may be used as a mechanism to regulate protein synthesis capacity in *O. streptacantha* under stress. In this work we isolated the full-length cDNA of the thirteen unigene that corresponds to *sui1* gene in order to obtain the information of a full-length cDNA of the ESTs of this SSH. Using a cDNA library of *O. streptacantha* constructed by our group of investigation, we isolated a cDNA of 767 bp for *Ostsui1 A*, and an isoform of the SUI1 protein that we named *Ostsui1 B* (782 bp). The identity between *Ostsui1 A* and *Ostsui1 B* was 71.4%. The deduced amino acid sequence of the SUI1 A protein and SUI1 B exhibited 89.4% and 86.6% of identity with the SUI1 protein from *Populus trichocarpa* and *Vitis vinifera* respectively.

Ubiquitin-conjugating enzymes (UBC) play a key role in ubiquitin-mediated proteolysis by catalyzing the conjugation of ubiquitin to protein substrates. Seki et

al (2002a) analyzed the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments, a mediator in triggering plant responses to various environmental stresses, using a full-length cDNA microarray. The ubiquitin conjugating enzyme was one of the up-regulated genes by ABA treatment. Evidence for the participation of the UBC enzymes in response to stress has been reported, for example in tomato, the *ubc1* gene was up-regulated in response to heat shock and heavy metal stresses (Feussner et al., 1997). Our result suggests that in *Opuntia* the UBC maybe is involved in the proteolytic degradation of abnormal proteins as result of stress.

S-adenosylmethionine synthetase (SAMS) catalyzes the biosynthesis of S-adenosyl-L-methionine, a precursor for the biosynthesis of betaine, lignin, ethylene and polyamines. Although the *Sams* gene is considered to be a housekeeping gene because S-adenosyl-L-methionine is essential for living cells as a methyl group donor for the biosynthesis of the compounds previously mentioned (Moffatt and Weretilnyk, 2001), it has been showed that it is regulated in a tissue-specific form and by stress (Peleman et al., 1989; Gowri et al., 1991). The over-expression of the *Sams* gene in water and heat stressed *O. streptacantha* suggests that could be involved in response to these stresses. *Lycopersicon esculentum* and *Catharanthus roseus* possess at least three and four *Sams* genes, respectively, that are differentially transcribed in response to various stress conditions including salinity (Espartero et al., 1994; Schröder et al., 1997). On the other hand, salt stress enhances the expression of *Sams* in lignifying tissues of tomato plants (Sanchez-Aguayo et al., 2004). In rice, the *Sams* gene was accumulated under

water stress (Van Breusegem et al., 1994) and in salt-tolerant rice this gene was induced by NaCl treatment (Shiozaki et al., 2005).

In plants the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase catalyzes the conversion of fructose 6-phosphate to fructose 1,6-bisphosphate in the cytosol. In rice plants was analyzed transcript levels of genes associated with glycolysis under flooding stress. The phosphofructokinase showed the maximum level of transcript after 24 h of submergence (Umeda and Uchimiya, 1994). RT-PCR technique is a tool widely used in the analysis of the genetic expression. When we analyzed the differential expression of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit (*Ostpdpk $\alpha$* ) by RT-PCR analysis, we obtained two bands differentially expressed, one of the expected size of 436 bp and interestingly another one band of higher size (485 bp) (Fig. 6A). In order to determine the identity of this transcript, both RT-PCR products were cloned and sequenced. The first one, as expected, corresponded to *Ostpdpk $\alpha$*  (1), and the second one was almost identical to *Ostpdpk $\alpha$*  (1); it contains an additional fragment of 79 bp and we named it *Ostpdpk $\alpha$*  (2). The high sequence similarity between both transcripts suggests that these are derived from the same gene by alternative splicing. In order to confirm this hypothesis a unique genomic region of 1452 pb was amplified, using the same set of primers with which we generated *Ostpdpk $\alpha$*  (1), and *Ostpdpk $\alpha$*  (2) fragments. This genomic region contains 6 exons and 5 introns (Gen Bank accession no. X). Sequence comparison of this genomic region with those of the *Ostpdpk $\alpha$*  (1), and *Ostpdpk $\alpha$*  (2) transcripts showed that *Ostpdpk $\alpha$*  (1) was originated by removing the introns and joining the exons all together while in *Ostpdpk $\alpha$*  (2) in addition to the

exons, the intron that corresponds to number 13 in *A. thaliana* was retained by an alternative splicing event in *Ostpdpk $\alpha$ 2* (Fig 6B and C). Alternative splicing is a posttranscriptional regulatory mechanism in modulating gene expression and important source of protein diversity in higher eukaryotes, and is often regulated in a temporal or tissue-specific fashion and as a consequence of environmental stress conditions. It has been shown that the occurrence of alternative splicing events in *A. thaliana* is about 11.6% (Iida et al., 2004). Among the five alternative splicing types in *Arabidopsis* and rice, intron retention is the most prevalent alternative splicing (Bing-Bing and Volker, 2006). Stresses have a dramatic effect on alternative splicing of pre-mRNAs (Reddy, 2007). For example low temperature promotes intron retention in two genes of wheat (Mastrangelo et al., 2005).

Genes encoding a lipid transfer protein, a glutathione S-transferase, a dehydroascorbate reductase, and delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase (*Osp5cs*) were found among the differentially expressed transcripts (Fig. 3: 6, 7, 8, 9). Enhanced expression of all of these genes, except dehydroascorbate reductase, were evident in *A. thaliana* subjected to a combination of drought and heat stress (Rizhsky et al., 2004). Lipid transfer proteins may have a function in repairing stress induced damage in membranes or changes in the lipid composition of membranes, perhaps to regulate the fluidity of the membrane. Reactive oxygen species are usually generated under normal activities of the cell like photorespiration,  $\beta$ -oxidation and NADPH activity. However their levels increase when the plants are exposed to biotic and abiotic stress, generating this way an oxidative stress. Glutathione S-transferase is an antioxidant enzyme and plays an important role in stress tolerance and detoxification metabolism in plants

(Anderson and Davis, 2004). The diminution of the oxidative damage and the increase in the resistance to different environmental stresses is correlated with the participation of an antioxidant system efficient. For example, the over-expression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the cold and salt tolerance in tobacco plants (Roxas et al., 1997). On the other hand, dehydroascorbate reductase enzyme reduces dehydroascorbate to ascorbate with glutathione as the electron donor. L-ascorbate (vitamin C) is important for antioxidative and metabolic functions in both plants and humans. In a recent study the overexpression of rice dehydroascorbate reductase in *A. thaliana* reported an enhanced plant tolerance to salt stress (Ushimaru et al., 2006). As described in the results, at day 13, a notable increase in the proline levels was detected in the cladodes of *O. streptacantha* subjected to water and heat stress (Fig. 1), correlating with the transcript up-regulation of *Osp5cs* gene (Fig. 3: 9). Differential regulation of *Osp5cs* gene has been reported in *O. streptacantha* subjected to salt stress (Silva-Ortega et al., 2008). Under these conditions the *Osp5cs* gene of *O. streptacantha* was induced by salt stress at days 9 and 11 of treatment. Furthermore, ABA-induced *Osp5cs* gene expression was observed in cladodes of cactus pear young plants (Silva-Ortega et al., 2008). L-proline is synthesized from L-glutamic acid via  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate. This reaction is catalyzed by two enzymes, pyrroline-5-carboxylate synthetase, the key enzyme, and pyrroline-5-carboxylate reductase. Proline is probably the most widely distributed compatible solute found in plants in salinity and water deficit conditions (Delauney and Verma, 1993). Proline acts as osmoprotectant, it can also function as a protein stabilizer, and as a hydroxyl radical scavenger, stabilizes cell membranes by interacting with

phospholipids, and serves as a source of carbon and nitrogen (Kavi Kishor et al., 2005). The Pro accumulation might function as an osmolyte for the intracellular osmotic adjustment and might be playing a critical role in protecting *O. streptacantha* plants under water and heat stress.

Another interesting group to which belong 13% of the unigenes is the chloroplast associated and photosynthesis category; these include genes encoding proteins that are involved in the photosynthesis process.

Putative NADH-dependent hydroxypyruvate reductase, type III chlorophyll a/b binding protein and carbonic anhydrase genes are up-regulated in drought and heat stress (Fig. 3: 10, 11, 12). In drought-stressed leaves, CO<sub>2</sub> assimilation can be decreased by stomatal and metabolic effects (Aguado-Santacruz, 2006). This reduction results in reduced electron consumption by photosynthesis. Additionally, inhibition of photosynthetic CO<sub>2</sub> fixation by high temperature has been documented in many plant species. Several components of the photosynthetic apparatus and associated metabolic processes are heat labile. For example, photosystem II is thermally labile (Havaux, 1993; Havaux and Tardy, 1996) but can be acclimated to heat stress (Havaux, 1993). A proteomic analysis of rice plants grown under chilling stress showed that cold caused the degradation of photosynthetic proteins (Shun-Ping et al., 2006). On the other hand, in barley subjected to drought stress the amount of NADH-dependent hydroxypyruvate reductase protein increase, therefore photorespiration could serve as an important means to maintain electron flow under stress (Wingler et al., 2000). *Mesembryanthemum crystallinum* is a facultative crassulacean acid metabolism plant. In *M. crystallinum* the induction of crassulacean acid metabolism increases reproductive success under conditions of

drought and salt stress (Winter and Ziegler, 2004). The crassulacean acid metabolism plant consist of nocturnal uptake of CO<sub>2</sub> via open stomata, fixation by phosphoenolpyruvate carboxylase and vacuolar storage of CO<sub>2</sub> in the form of organic acids, mainly malic acid, and daytime remobilization of vacuolar organic acids, decarboxylation and refixation plus assimilation of CO<sub>2</sub> within closed stomata in the Calvin cycle. Cactus pear performs photosynthesis through the crassulacean acid metabolism too. Additionally to putative NADH-dependent hydroxypyruvate reductase, type III chlorophyll a/b binding protein and carbonic anhydrase we obtained other genes like subunit XI of photosystem I reaction center, putative chloroplast chaperonin, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit, protein of photosystem II, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit, phosphoenolpyruvate carboxylase, and photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein (Table 2) that are all involved in the photosynthesis process. Moreover, in a cDNA library constructed by our group (data not shown) we obtained more genes related to this process.

Because plants growing in the field are often subjected to a combination of stresses such as drought and heat, studying the response of plants to a combination of different stresses may be critical to our understanding of stress tolerance in plants. The complexity of plants in response to drought and heat stress suggests that a large number of genes are involved in stress response pathways, although only a few molecular components have been defined until recently. To our knowledge, the ESTs of *Opuntia* reported in this work are the first cDNA sequences related to the stress response of this important crassulacean acid



metabolism cactus pear. These sequences may therefore provide new insights into the knowledge of the two major problems limiting the surviving and growth of plants, particularly in semiarid and arid climates: extreme temperatures and lack of available water.

## **Acknowledgements**

This work was supported by the Fondo Sectorial de Investigación en Materias Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Filogenéticos SAGARPA-CONACYT (Project 0216-SAGARPA).

## 5. Legends to figures

**Figure 1.** Characterization of water and heat stressed *Opuntia streptacantha* young plants. Proline content in cladodes of *Opuntia streptacantha* young plants subject to water and heat stress during 12 and 13 days. Data are means  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

**Figure 2.** Distribution of differentially expressed gene transcripts in water and heat stress cactus pear suppression subtractive hybridization. Total 122 unigenes with hits to BLASTx database were grouped into 10 functional categories. The percentage of gene transcripts in each group is listed with the function.

**Figure 3.** RT-PCR analysis of transcript levels of cactus pear genes differentially expressed in *Opuntia streptacantha* young cladodes under water and heat stress. Number designation is indicated to the left of each panel. 1. putative systemin receptor SR160 2. putative phosphatase 2A inhibitor 3. adp-ribosylation factor 4. ethylene-responsive transcriptional coactivator-like protein 5. homeobox 2 protein 6. lipid transfer protein 7. glutathione s-transferase 8. dehydroascorbate reductase 9. delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase 10. putative NADH-dependent hydroxypyruvate reductase 11. type III chlorophyll a/b binding protein 12. carbonic anhydrase 13. SUI 1 protein 14. s-adenosylmethionine synthetase 15. putative carboxyphosphoenol-pyruvate mutase 16. alkaline alpha-galactosidase seed imbibition protein 17. putative dolichyldiphosphooligosaccharide protein 18. hydrolase 19. pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit 20. 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 21. fructose-

biphosphate aldolase 22. f-box protein 23.unknown protein (77) 24. unknown protein (79) 25. unknown protein (82) 26. unknown protein (88). For amplify each fragment specific primers were designed from SSH cDNA sequences. Fifteen µl of the PCR product was loaded on each lane and separated by electrophoresis on 1% (w/v) agarose gel. *Opuntia streptacantha* elongation factor EF-1 gene was used as loading control. The histogram shows relative abundance of each cDNA after normalization with the elongation factor EF-1 signal.

**Figure 4.** (A) Multiple amino acid alignment as derived by identity of translation initiation factor A and B (*Ostsui1 A* and *Ostsui1 B*) from *Opuntia streptacantha*. Identical residues (asterisk) in the two proteins and conserved amino acid substitutions (dots) are indicated. Dashes show gaps in the amino acid sequences introduced to optimize alignment. Comparisons and protein sequence alignment were carried out using the ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) program. (B) Phylogenetic dendrograms of translation initiation factor of Pt, *Populus trichocarpa* (GenBank accession no. ABK93182), OsA, *Opuntia streptacantha* (GenBank accession no. EU239956), Ca, *Coffea arabica* (GenBank accession no. CAD58629), St, *Solanum tuberosum* (GenBank accession no. DQ222518.1), Ss, *Sporobolus stapfianus* (GenBank accession no. Q9SM41), Pp, *Pinus pinaster* (GenBank accession no. CAC84489), OsB, *Opuntia streptacantha* (GenBank accession no. EU239957), At, *Arabidopsis thaliana* (GenBank accession no. NP\_568818), Vv, *Vitis vinifera* (GenBank accession no. CAO38954). Construction of the phylogenetic tree and bootstrap analysis (1000 replicates) were performed with MEGA 4 version.

**Figure 5.** RT-PCR analysis of transcript levels of *sui1* gene under different abiotic stress conditions. Fifteen  $\mu$ l of the PCR product was loaded on each lane and separated electrophoresis on 1% (w/v) agarose gel. *Opuntia streptacantha* actin gene was used as loading control. The histogram show relative abundance of each cDNA after normalization with the actin signal.

**Figure 6.** (A) RT-PCR analysis of transcript levels of pyrophosphate-dependent phosphofruktokinase alpha subunit 1 (1) and pyrophosphate-dependent phosphofruktokinase alpha subunit 2 (2) genes differentially expressed in *Opuntia streptacantha* young cladodes under water and heat stress. Fifteen  $\mu$ l of the PCR product was loaded on each lane and separated electrophoresis on 1% (w/v) agarose gel. *Opuntia streptacantha* elongation factor EF-1 gene was used as loading control. The histogram show relative abundance of each cDNA after normalization with the elongation factor EF-1 signal. (B) Multiple amino acid alignment as derived by identity of pyrophosphate-dependent phosphofruktokinase alpha subunit fragments: *Ostpdpk $\alpha$*  (0) from *Opuntia streptacantha* genomic and *Ostpdpk $\alpha$*  (1 and 2) from *Opuntia streptacantha* cDNA. Comparisons and protein sequence alignment were carried out using the ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) program. (C) Scheme of alternative splicing that occurs in *Ostpdpk $\alpha$ 2*. The empty rectangles represent exons and the black rectangles represent introns.

## 6. References

- Aguado-Santacruz GA (2006) Genetic manipulation of plants for increased drought tolerance. In: Genetic manipulation of plants for increased drought tolerance. In: Advances in agricultural and food biotechnology (347 p). Guevara-González RG, Torres-Pacheco I. eds Research Signpost. Kerala, India pp. 71-97.
- Alfonso M, Yruela I, Almarcegui S, Torrado E, Perez MA, Picorel R (2001) Unusual tolerance to high temperatures in a new herbicide-resistant D1 mutant from *Glycine max* (L.) Merr. Cell cultures deficient in fatty acid desaturation. *Planta* 212: 573-582.
- Anderson JV, Davis DG (2004) Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. *Physiol Plant* 120: 421-433.
- Ariel FD, Manavella PA, Dezar CA, Chan RL (2007) The true story of the HD-Zip family. *Trends Plant Sci* 12: 419-426.
- Bartels D, Sunkar R (2005) Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci* 24: 23-58.
- Bijlsma R, Loeschcke V (2005) Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *J Evol Biol* 18: 744-749.
- Bing-Bing W, Volker B (2006) Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7175-7180.
- Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448.
- Bray EA (2004) Genes commonly regulated by water-deficit stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 55: 2331–2341.

Cao YF, Wu YF, Zhang Z, Song FM (2006) Overexpression of the rice EREBP-like gene OsBIERF3 enhances disease resistance and salt tolerance in transgenic tobacco. *Physiol Mol Plant Pathol* 67: 202-211.

Chen WJ, Zhu T (2004) Networks of transcription factors with roles in environmental stress response. *Trends Plant Sci* 9: 591–596.

Delauney AJ, Verma DPS (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal* 4: 215-223.

Diatchenko L, Lau YC, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang R, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (1996) Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated of tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 6025-6030.

Dombrowski JE (2003) Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants. *Plant Physiol* 132: 2098-2107.

Dong YS, Fatma K, Kil-Jae L, Charles LG (2003) Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends Plant Sci* 8: 179-187.

Espartero J, Pintor-Toro JA, Pardo JM (1994) Differential accumulation of S-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress. *Plant Mol Biol* 25: 217–227.

Feussner K, Feussner I, Leopold I, Wasternack C (1997) Isolation of a cDNA coding for an ubiquitin-conjugating enzyme UBC1 of tomato--the first stress-induced UBC of higher plants. *FEBS Lett* 409: 211-215.

Flores-Hernández A, Murillo-Amador B, García-Hernández JL, Fraga-Palomino HC (2001) Concentración de prolina en brotes de cultivares de nopal (*Opuntia megacantha*) sometidos a estrés por calor. *Phyton* 65: 15-24.

Franco-Salazar VA, Véliz JA (2007) Respuestas de la tuna [*Opuntia ficus-indica* (L.) MILL.] al NaCl. *Interciencia* 32: 125-130.

Fujimoto SY, Ohta M, Usui A, Shinshi H, Ohme-Takagi M (2000) Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box mediated gene expression. *Plant Cell* 12: 393–404.

Gallie DR, Le H, Tanguay RL, Browning KS (1998) Translation initiation factors are differentially regulated in cereals during development and following heat shock. *The Plant Journal* 14: 715-722.

Gehring WJ (1987) Homeoboxes in the study of development. *Science* 236: 1245–1252.

Gowri G, Bugos RC, Campbell WH, Maxwell, CA, Dixon RA (1991) Stress response in alfalfa (*Medicago sativa* L.). X. Molecular cloning and expression of S-adenosyl-L-methionine: caffeic acid 3-O-methyltransferase, a key enzyme of lignin biosynthesis. *Plant Physiol* 97: 7–14.

Havaux M (1993) Characterization of thermal damage to the photosynthetic electron transport system in potato leaves. *Plant Sci* 94: 19-33.

Havaux M, Tardy F (1996) Temperature-dependent adjustment of the thermal stability of photosystem I1 in vivo: possible involvement of xanthophyll-cycle pigments. *Planta* 198: 324-333.



Iida K, Seki M, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Toyoda T, Konagaya A, Shinozaki K (2004) Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing in *Arabidopsis thaliana* based on full-length cDNA sequences. *Nucleic Acids Res* 32: 5096-5103.

Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 377-403.

IPCC (2007a) Climate Change 2001. Impacts, Adaptation and Vulnerability. International Panel of Climate Change, Geneva, Switzerland.

IPCC (2007b) Climate Change 2001: the Scientific Basis. International Panel of Climate Change, Geneva, Switzerland.

Jaglo-Ottosen K, Gilmour S, Zarka D, Schabenberger O, Thomashow M (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104–106.

Kavi Kishor PB, Sangam S, Amrutha RN, Sri Laxmi P, Naidu KR, Rao KRSS, Rao S, Reddy KJ, Theriappan P, Sreenivasulu N (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Curr Sci* 88: 424-438.

Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, Wang H, Brazille S, Kawai K, Galbraith D, Bohnert HJ (2001) Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice. *Plant Cell* 13: 889–906.

Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J (2000) Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 2940-2945.

Larkindale J, Knight MR (2002) Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiol* 128: 682-695.

Le Houréou HN (1996) The role of cacti (*Opuntia* spp.) in erosion control, land reclamation, rehabilitation and agricultural development in the Mediterranean Basin. *J Arid Environ* 33: 135-159.

Lee JH, Hong JP, Oh SK, Lee S, Choi D, Kim WT (2004) The ethylene-responsive factor like protein 1 (CaERFLP1) of hot pepper (*Capsicum annuum* L.) interacts in vitro with both GCC and DRE/CRT sequences with different binding affinities: possible biological roles of CaERFLP1 in response to pathogen infection and high salinity conditions in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol* 55: 61–81.

Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391–1406.

Magne C, Larher F (1992) High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Anal Biochem* 200: 115-118.

Maruyama K, Sakuma Y, Kasuga M, Ito Y, Seki M, Goda H, Shimada Y, Yoshida S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004) Identification of cold-inducible downstream genes of the *Arabidopsis* DREB1A/CBF3 transcriptional factor using two microarray systems. *The Plant Journal* 38: 982–993.

Mastrangelo AM, Belloni S, Barilli S, Ruperti B, Di Fonzo N, Stanca AM, Cattivelli L (2005) Low temperature promotes intron retention in two e-cor genes of durum wheat. *Planta* 221: 705–715.

Mazarel M, Puthoff DP, Hart JK, Rodermeel SR, Baum T (2002) Identification and characterization of a soybean ethylene responsive element-binding protein gene whose mRNA expression changes during soybean cyst nematode infection. *Mol Plant Microbe Interact* 15: 577–586.

Meindl T, Boller T, Felix G (1998) The plant wound hormone systemin binds with the N-terminal part to its receptor but needs the C-terminal part to activate it. *Plant Cell* 10: 1561–1570.

Mittler R, Merquiol E, Hallak-Herr E, Rachmilevitch S, Kaplan A, Cohen M (2001) Living under a “dormant” canopy: a molecular acclimation mechanism of the desert plant *Retama raetam*. *The Plant Journal* 25: 407-416.

Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* 11: 15-19.

Moffatt BA, Weretilnyk EA (2001) Sustaining S-adenosyl-L-methionine dependent methyltransferase activity in plant cells. *Physiol Plant* 113: 435-442.

Nobel PS (1995) Environmental Biology. In: Barbera G, Inglese P, Pimienta-Barrios E, ed. *Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear*, Plant Production and Protection Rome, Italy: FAO, 36-48.

Ohme-Takagi M, Shinshi H (1995) Ethylene-inducible DNA binding protein that interacts with an ethylene-responsive element. *Plant Cell* 14: 2565–2575.

Park JM, Park CJ, Lee SB, Ham BK, Shin R, Paek KH (2001) Overexpression of the tobacco *Tsi1* gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances

resistance against pathogen attack and osmotic stress in Tobacco. *Plant Cell* 13: 1035-1046.

Pearce G, Strydom D, Johnson S, Ryan CA (1991) A polypeptide from tomato leaves induces wound-inducible proteinase inhibitor proteins. *Science* 253: 895-898.

Peleman J, Boerjan W, Engler G, Seurinck J, Botterman J, Alliotte T, Van Montagu M, Inzé D (1989) Strong cellular preference in the expression of a housekeeping gene of *Arabidopsis thaliana* encoding S-adenosyl-methionine synthetase. *Plant Cell* 1: 81–93.

Pimienta-Barrios E (1994) Prickly pear (*Opuntia* spp.): a valuable fruit for the semi-arid land of Mexico. *J Arid Environ* 28: 1-11.

Rausell A, Kanhonou R, Yenush L, Serrano R, Ros R (2003) The translation initiation factor eIF1A is an important determinant in the tolerance to NaCl stress in yeast and plants. *The Plant Journal* 34: 257-267.

Rebman JP, Pinkava DJ (2001) *Opuntia* cacti of north America – an overview. *Fla Entomol* 84: 474-483.

Reddy AS (2007) Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. *Annu Rev Plant Biol* 58: 267-94.

Rhodes D, Hanson AD (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 357-384.

Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R. (2004) When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol* 134: 1683-1696.

Romero-Schmidt HL, Vega-Villasante F, Nolasco H, Montaña C (1992) The effect of darkness, freezing, acidity and salinity on seed germination of *Ferocactus peninsulae* (Cactaceae). *J Arid Environ* 23: 389-395.

Rosegrant MW, Cline SA (2003) Global food security: challenges and policies. *Science* 302: 1917–1919.

Roxas VP, Smith RK, Allen ER, Allen RD (1997) Over-expression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco during stress. *Nat Biotechnol* 15: 988-991.

Salvucci ME, Crafts-Brandner SJ (2004) Relationship between the heat tolerance of photosynthesis and the thermal stability of rubisco activase in plants from contrasting thermal environments. *Plant Physiol* 134: 1460-1470.

Sanchez-Aguayo I, Rodríguez-Galán JM, García R, Torreblanca J, Pardo JM (2004) Salt stress enhances xylem development and expression of S-adenosyl-L-methionine synthase in lignifying tissues of tomato plants. *Planta* 220: 278–285.

Sangwan V, Orvar BL, Beyerly J, Hirt H, Dhindsa RS (2002) Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *The Plant Journal* 31: 629-638.

Scheer JM, Ryan CA (1999) A 160-kD systemin receptor on the surface of *Lycopersicon peruvianum* suspension-cultured cells. *Plant Cell* 11: 1525-1536.

Scheer JM, Ryan CA (2002) The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 9585-9590.

Schröder G, Eichel J, Breining S, Schröder J (1997) Three differentially expressed S-adenosylmethionine synthetase from *Catharantus roseus*: molecular and functional characterization. *Plant Mol Biol* 33: 211–222.

Scofield S, Murray JAH (2006) Knox gene function in plant stem cell niches. *Plant Mol Biol* 60: 929-946.

Seki M, Ishida J, Narusaka M, Fujita M, Nanjo T, Umezawa T, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002a) Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray. *Funct Integr Genomics* 2: 282-91.

Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2001) Monitoring the expression pattern of 1300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* 13: 61-72.

Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K (2002b) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *The Plant Journal* 31: 279–292.

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M (2003) Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 6: 410-417.

Shiozaki N, Yamada M, Yoshiba Y (2005) Analysis of salt-stress-inducible ESTs isolated by PCR-subtraction in salt-tolerant rice. *Theor Appl Genet* 110: 1177-1186.

Shun-Ping Y, Qun-Ye Z, Zhang-Cheng T, Wei-Ai S, Wei-Ning S (2006) Comparative proteomic analysis provides new insight into chilling stress response in rice. *Mol Cell Proteomics* 5: 484-496.

Silva-Ortega CO, Ochoa-Alfaro AE, Reyes-Agüero JÁ, Aguado-Santacruz GA, Jiménez-Bremont JF (2008) Salt stress increases the expression of *p5cs* gene and induces proline accumulation in cactus pear. *Plant Physiol Biochem* 46: 82-92.

Singh K, Foley RC, Oñate-Sánchez L (2002) Transcription factors in plant defence and stress responses. *Curr Opin Plant Biol* 5: 430–436.

Stone P (2001) The effects of heat stress on cereal yield and quality. In: Basra AS, ed. *Crop Responses and Adaptations to Temperature Stress*, Food Products Press, Binghamton, NY, 243-291.

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24: 1596-1599.

Tang W, Newton RJ, Lin J, Charles TM (2006) Expression of a transcription factor from *Capsicum annuum* in pine calli counteracts the inhibitory effects of salt stress on adventitious shoot formation. *Mol Genet Genomics* 276: 242–253.

Tournier B, Sanchez-Ballesta MT, Jones B, Pesquet E, Regad F, Latche A, Pech JC, Bouzayen M (2003) New members of the tomato ERF family show specific expression pattern and diverse DNA-binding capacity to the GCC box element. *FEBS Lett* 550: 149-154.

Umeda M, Uchimiya H (1994) Differential transcript levels of genes associated with glycolysis and alcohol fermentation in rice plants (*Oriza sativa* L.) under submergence stress. *Plant Physiol* 106: 1015-1022.

Ushimaru T, Nakagawa T, Fujioka Y, Daicho K, Naito M, Yamauchi Y, Nonaka H, Amako K, Yamawaki K, Murata N (2006) Transgenic Arabidopsis plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. *J Plant Physiol* 163: 1179-1184.

Van Breusegem F, Dekeyser R, Gielen J, Van Montagu M, Caplan A (1994) Characterization of a S-adenosylmethionine synthetase gene in rice. *Plant Physiol* 105: 1463–1464.

Wingler A, Lea PJ, Quick P, Leegood RC (2000) Photorespiration: metabolic pathways and their role in stress protection. *Philos Trans R Soc London* 355: 1517-1529.

Winter K, Ziegler H (2004) Induction of crassulacean acid metabolism in *Mesembryanthemum crystallinum* increases reproductive success under conditions of drought and salinity stress. *Oecologia* 92: 475-479.

Xiong LM, Schumaker KS, Zhu JK (2002) Cell signal during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14: 165-183.

Xu ZS, Xia LQ, Chen M, Cheng XG, Zhang RY, Li LC, Zhao YX, Lu Y, Ni ZY, Liu L, Qiu ZG, Ma YZ (2007) Isolation and molecular characterization of the *Triticum aestivum* L. ethylene-responsive factor 1 (TaERF1) that increases multiple stress tolerance. *Plant Mol Biol* 65: 719-32.

Yalamanchili RD, Stratmann J (2002) Ultraviolet-B activates components of the systemin signaling pathway in *Lycopersicon peruvianum* suspension cultured cells.



Ultraviolet-B activates components of the systemin signaling pathway in *Lycopersicon peruvianum* suspension J Biol Chem 277: 28424–28430.

Zhang HB, Zhang DB, Chan J, Yang YH, Huang ZJ, Huang DF, Wang C, Huang RF (2004) Tomato stress responsive factor TSRF1 interacts with ethylene responsive element GCC box and regulates pathogen resistance to *Ralstonia solanacearum*. Plant Mol Biol 55: 825-834.

Zheng J, Zhao J, Tao Y, Wang J, Liu Y, Fu J, Jin Y, Gao P, Zhang J, Bai Y, Wang G (2004) Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA macroarray. Plant Mol Biol 55: 807-823.

## 7. Figures

Figure 1

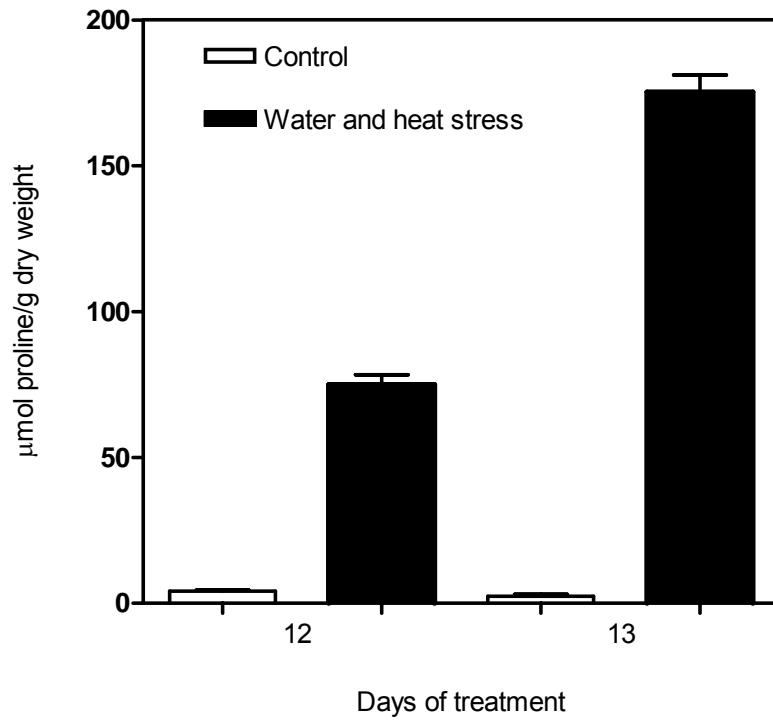


Figure 2

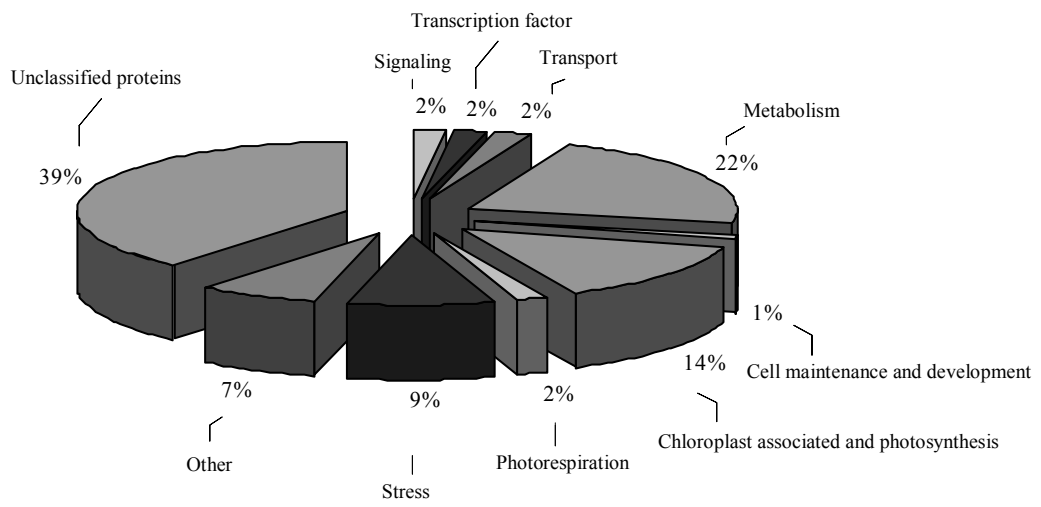


Figure 3

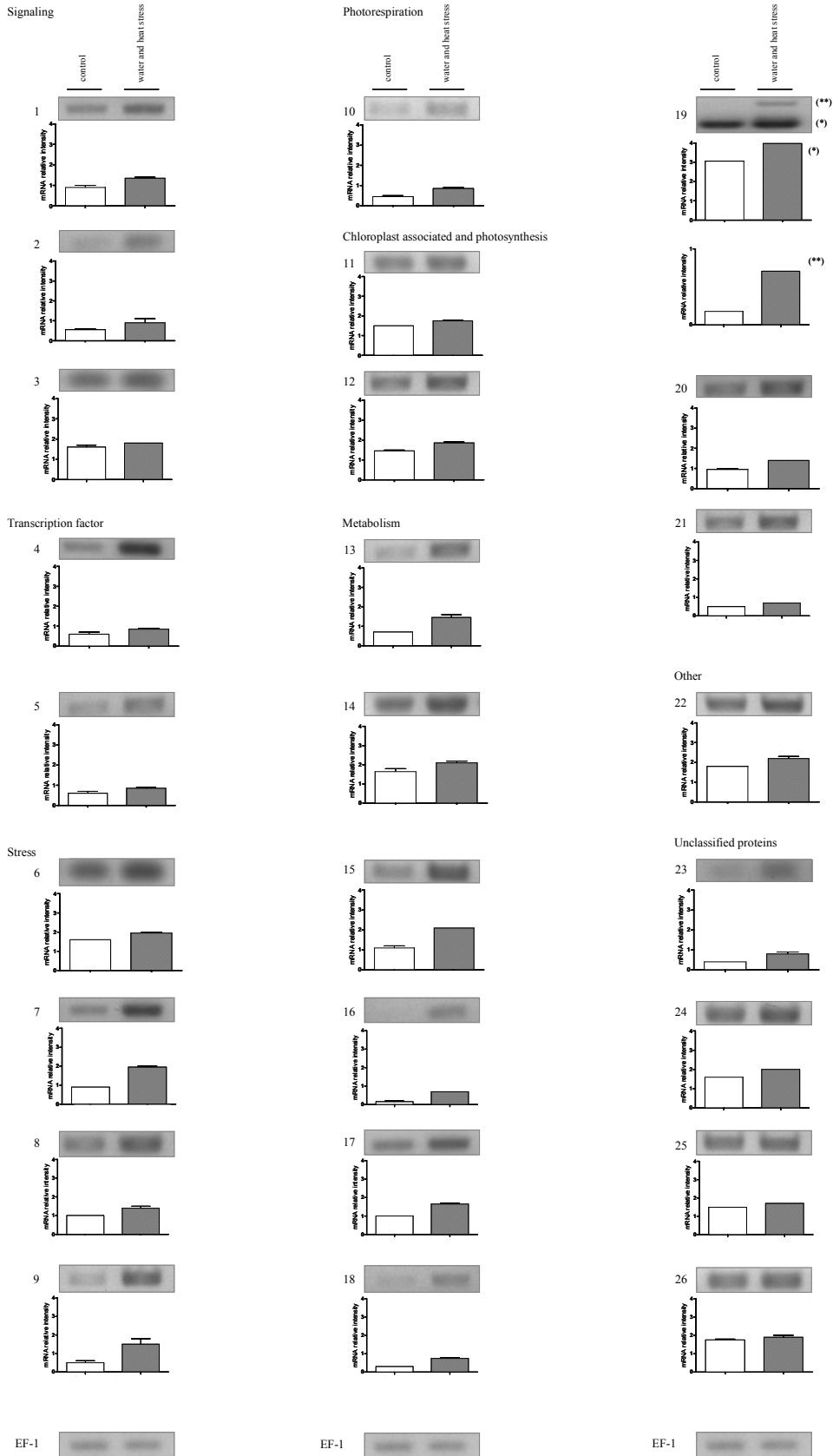


Figure 4

A

```

OstsuilA MSDLDIQVPAAYDPFADANAENSGAGAKDYVHIRVQQRNGRKSLLTVQGLNKQFYSYNKILKDLKKEFCNGTVVXDPELG 80
OstsuilB MVDYEVQIPAAFDPFSGAK-DSGAPGAKEYVRIRIQQRNGKKSLLTVQGLRKDFS YERILKDLKKEFCNGNVVQDKELG 79
* * ::*:***:***:..: :... ***:**:*:***:*****:*****:*.***:*****:*****.* * **

OstsuilA QVIQLQGXRKNVSTFLVQAGIVKKEHIKIHGF 113
OstsuilB KIIQLQGDQRKNVANFLVQAGLVKKDHIKIHGF 112
:***** ***:..*****:***:*****

```

B

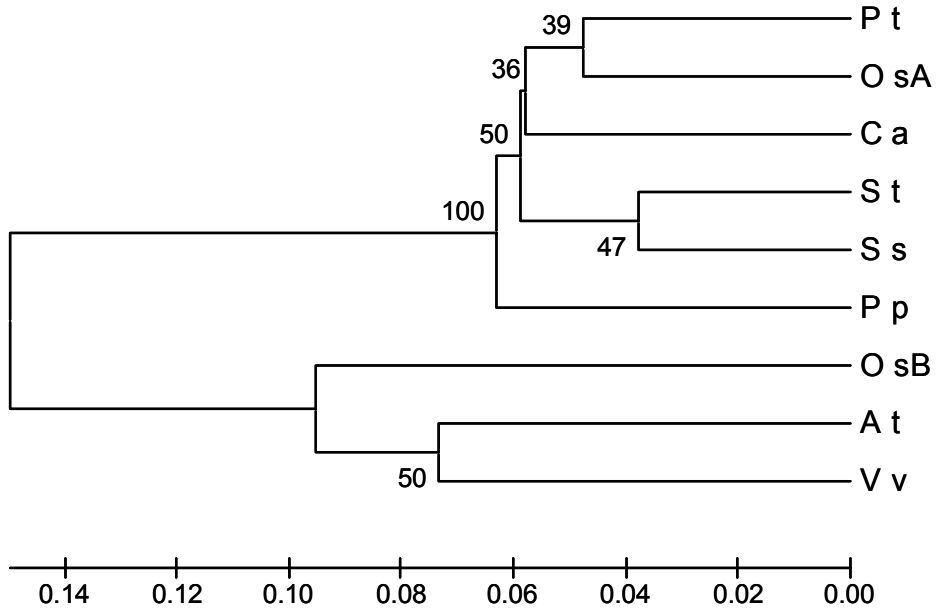


Figure 5

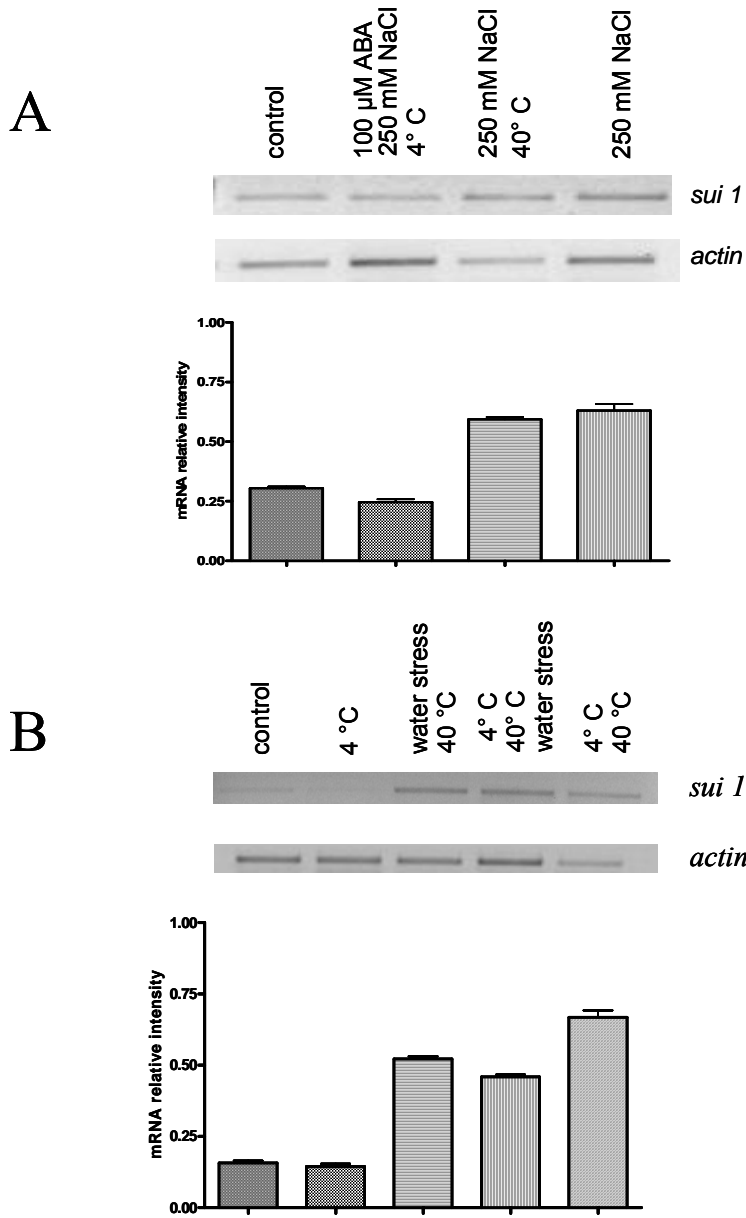


Figure 6

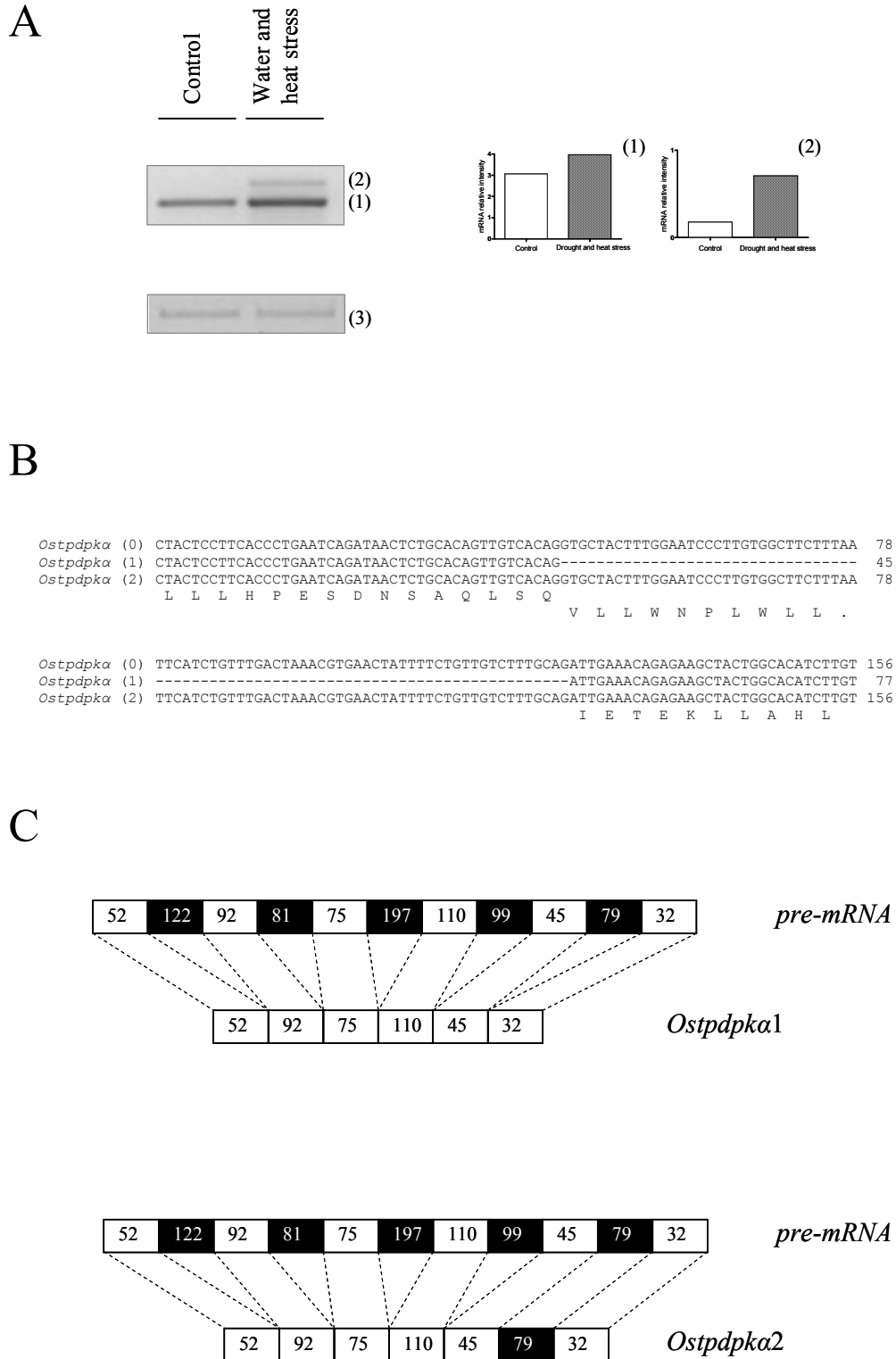


Table 1.

Gene	Designed primers	Size of the fragment (pb)
putative systemin receptor SR160	s 5'-GTAACAGAACTAGATCTCTCGG-3'	573
	as 5'-TAATGTTCCCTGTCCGTCCTGAA-3'	
putative phosphatase 2A inhibitor	s 5'- GAAGATACAAAGCTTACCAAGAC-3'	265
	as 5'-CATTGTTGAAGTAGGTGAGTG-3'	
adp-ribosylation factor	s 5'-ACTGGACTGGCTCTCAAAC-3'	254
	as 5'-CGAAACTCCATAAACTCAACTACA-3'	
ethylene-responsive transcriptional coactivator-like protein	s 5'-CGGTTGTGCTTCACAAATCGA-3'	306
	as 5'-CATACTCCTGAACAACCTGAG-3'	
homeobox 2 protein	s 5'-CAACTATTAGCTGCTCATGTTGC-3'	358
	as 5'-GGTACTCTAACTGCATGTCATC-3'	
lipid transfer protein	s 5'- ATGGCTAGCTCAACTTCCTTCAAG-3'	347
	as 5'-TTGGAGCAGTCGACGCTCAT-3'	
glutathione s-transferase	s 5'-CCTGAATTCCTCAAACCTCCAG-3'	323
	as 5'-CCATCATAGACATCGAGCAC-3'	
dehydroascorbate reductase	s 5'- GTACATGCAGTTGCTGTTCTC-3'	359
	as 5'-CCATATGATTATCCACCAGCC-3'	
delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase	s 5'- GACTTGATGATGTAATTGACCTTGTC-3'	159
	as 5'-CAATGCGCCTTGCCATATCCATG-3'	
putative NADH-dependent hydroxypyruvate reductase	s 5'-ATTGGAGACAAGTGTGATGGAG-3'	390
	as 5'-GAATCCTTCAACCATCATTCTCG-3'	
type III chlorophyll a/b binding protein	s 5'-GTGTTTAAAATGGCTCTCATG-3'	343
	as 5'-TGAGGCTAGTCAAGATGTTG-3'	
carbonic anhydrase	s 5'-GAAAGCGTATGAGGAAGC-3'	476
	as 5'-CATCATCAGGGATGGACAT-3'	
sui 1 protein	s 5'- TTATGTGCACATCCGTGTAC-3'	222
	as 5'-ACAATGCCAGCCTGAAC-3'	
s-adenosylmethionine synthetase	s 5'-GAAGTGTACCTTGATGAGAAG-3'	448
	as 5'-AGTGACCATATGCAGCTGT-3'	
putative carboxyphosphoenolpyruvate mutase	s 5'-GACTTCAGTAGCCAAACATGCC-3'	274
	as 5'-ACAAATTCTACGAGCAACTTCGGTC-3'	
alkaline alpha-galactosidase seed imbibition protein	s 5'-GGTAATGGAGGAAGAGTTAG-3'	272
	as 5'-ACGCTATGAAACATATCCCCA-3'	



putative dolichyldiphospho- oligosaccharide protein	s 5'-GATGGCCTCGTCATCTTCGCT-3'	310
	as 5'-GGCAGGTAAGTGGAGCCTCAATT-3'	
Hydrolase	s 5'-ATTGCAAGTGCTGTTCTCGT-3'	355
	as 5'-AGTAGCAAGACATCCAAGATTG-3'	
pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit	s 5'-AGGCATCACATGTTGCATTG-3'	406
	as 5'-ACAAGATGTGCCAGTAGCT-3'	
2,3-bisphosphoglycerate- independent phosphoglycerate mutase	s 5'-GTGGCATCACCTTCAATGTG-3'	491
	as 5'-AATGAGTGTTGGCTCGTAGTC-3'	
fructose-biphosphate aldolase	s 5'-CGTGCCTTGCAGAGAACTGTT-3'	319
	as 5'-AGTCCTTGACATGAAGACTCTC-3'	
f-box protein	s 5'- CAAGATAAACCACAGCTTGA-3'	484
	as 5'-TCTGACAATAGTAGAGACCA-3'	
unknown protein (unigen 77)	s 5'-GAGCTTACGAAGAGAACTGTGA-3'	304
	as 5'-GACATTCCAGTGTTCCACATG-3'	
unknown protein (unigen 79)	s 5'-GAATGAAGCAGTTGATACGGCG-3'	431
	as 5'-AATGTGCTCGTCGGACGAGAA-3'	
unknown protein (unigen 82)	s 5'-GAGAAGCAAGTTATGATATTCGG-3'	298
	as 5'-CTATGATTTCCACAGAGACATG-3'	
unknown protein (unigen 88)	s 5'-AATGGCTGCGACTTATGCTGG-3'	296
	as 5'-CAGTGGACTTGTCTCGACTTTATC-3'	

**Table 2.**

Unigene	Contig	GenBank Accesión	No. of ESTs per contig	Annotation	<i>E</i> value
1 Signaling					
1	53	AAV32131	1	Putative systemin receptor SR160 [ <i>Oryza sativa</i> ]	4e-59
2	87	AAT08696	1	ADP-ribosylation factor [ <i>Hyacinthus orientalis</i> ]	0.004
3	91	AAF27100	1	Putative phosphatase 2A inhibitor [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	2e-39
2 Transcription factor					
4	32	AAL32037	1	ethylene-responsive transcriptional coactivator-like protein ERT [ <i>Retama raetam</i> ]	1e-55
5	68	AAD00253	1	Homeobox 2 protein [ <i>Lycopersicon esculentum</i> ]	8e-48
3 Transport					
6	60	CAD38520	1	putative cation transporter [ <i>Beta procumbens</i> ]	1e-67
	88	CAD38520	1	putative cation transporter [ <i>Beta procumbens</i> ]	3e-33
7	117	AAD21477	1	putative mitochondrial carrier protein [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	4e-58
8	133	AAC69180	1	peroxisomal targeting sequence 1 receptor [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	2e-36
4 Metabolism					
9	3	AAP83934	8	auxin-induced beta-glucosidase [ <i>Chenopodium rubrum</i> ]	9e-39
	33	AAP83934	12	auxin-induced beta-glucosidase [ <i>Chenopodium rubrum</i> ]	1e-116
	61	AAP83934	11	auxin-induced beta-glucosidase [ <i>Chenopodium rubrum</i> ]	7e-93
	111	AAP83934	1	auxin-induced beta-glucosidase [ <i>Chenopodium rubrum</i> ]	1e-37
10	38	AAQ21369	4	beta-galactosidase [ <i>Sandersonia aurantiaca</i> ]	8e-25

57	CAA06310	22	beta-galactosidase [Cicer arietinum]	2e-80	
59	CAA40459	8	CARSR12 putative beta- galactosidase [Dianthus caryophyllus]	3e-130	
11	10	XP_001470965	1	ATP-binding cassette transporter [Tetrahymena thermophila]	4.3
12	18	ABE92034	1	Tetratricopeptide-like helical [Medicago truncatula]	2e-10
13	21	CAD58629	4	SUI1 protein [Coffea arabica]	1e-52
136	CAC84489	1	putative translation factor [Pinus pinaster]	5e-32	
14	7	AAN03469	1	ubiquitin-conjugation enzyme [Glycine max]	4e-77
15	37	BAD29711	9	S-adenosyl-L-methionine synthase 5 [Atriplex nummularia]	5e-82
58	P93254	24	S-adenosylmethionine synthetase (Methionine adenosyltransferase) (AdoMet synthetase). [Mesembryanthemum crystallinum]	2e-97	
16	41	AAM47878	1	putative carboxyphosphoenolpyruvate mutase [Arabidopsis thaliana]	2e-20
17	45	AAN32954	1	alkaline alpha-galactosidase seed imbibition protein [Lycopersicon esculentum]	9e-55
18	46	AAO33154	1	putative transketolase [Oryza sativa]	5e-104
19	48	AAQ73181	1	plastidic alpha 1,4-glucan phosphorylase 3 [Triticum aestivum]	1e-83
20	49	NP_177343	1	peptidase/ protein binding / ubiquitin-protein ligase/ zinc ion Binding [Arabidopsis thaliana]	2e-11
21	54	XP_477102	1	putative dolichyldiphosphooligosaccharide-protein [Oryza sativa]	3e-37
22	55	BAB62078	1	transketolase [Polygonum tinctorium]	9e-05
23	63	NP_180811	2	hydrolase [Arabidopsis thaliana]	4e-33
24	65	CAA58775	1	glucose-6-phosphate dehydrogenase, chloroplast precursor [Solanum tuberosum]	2e-106
25	73	ABE93021	1	pentatricopeptide repeat [Medicago truncatula]	1e-44
26	74	NP_181315	1	oxidoreductase [Arabidopsis thaliana]	3e-05

27	80	CAA83682	1	pyrophosphate-dependent phosphofructokinase alpha subunit [ <i>Ricinus communis</i> ]	7e-76
28	106	NP_566884	1	ubiquitin conjugating enzyme/ ubiquitin-like activating enzyme [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	5e-61
29	109	CAB57250	1	putative ubiquitin carrier [ <i>Entodinium caudatum</i> ]	2e-10
30	110	ABD32840	1	Peptidase C1A, papain; Somatotropin hormona [ <i>Medicago truncatula</i> ]	2e-53
31	115	Q42908	1	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase (Phosphoglyceromutase) (BPG-independent PGAM) (PGAM-I). [ <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> ]	2e-73
32	127	AAB61592	1	Fructosa-biphosphate aldolase [ <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> ]	1e-42
33	132	NP_191580	1	ATP binding [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	2e-34
34	138	CAA49669	2	Bark storage protein [ <i>Populus deltoids</i> ]	7e-10
35	139	AAB61470	2	beta-D-galactosidase [ <i>Mangifera indica</i> ]	1e-34
5 Cell maintenance and development					
36	30	NP_564802	1	enzyme inhibitor/ pectinesterase/ pectinesterase inhibitor [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	1e-05
6 Chloroplast associated and photosynthesis					
37	6	NP_922780	3	Putative chloroplast chaperonin [ <i>Oryza sativa</i> ]	4e-08
38	14	CAA33330	1	Type III chlorophyll a/b-binding protein [ <i>Lycopersicon esculentum</i> ]	4e-64
39	15	AAA89099	1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [ <i>Pereskia aculeata</i> ]	4e-21
	50	AAA89099	1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [ <i>Pereskia aculeata</i> ]	2e-33
	89	AAV33288	5	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit [ <i>Buergersiochloa bambusoides</i> ]	2e-33
40	101	AAZ94659	1	RuBisCo large subunit [ <i>Cucumis sativus</i> ]	2e-24

41	16	CAA59409	1	Protein of photosystem II [ <i>Spinacia oleracea</i> ]	5e-29
42	34	P27141	8	Carbonic anhydrase, chloroplast precursor (Carbonate dehydratase) [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	4e-67
43	39	CAA45775	2	Subunit XI of photosystem I reaction center [ <i>Spinacia oleracea</i> ]	6e-17
44	44	AAG61120	1	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase [ <i>Gossypium hirsutum</i> ]	3e-08
45	56	CAA10290	1	Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase small subunit [ <i>Cicer arietinum</i> ]	3e-05
46	75	P10490	1	ppc1 protein [ <i>Mesembryanthemum crystallinum</i> ]	6e-60
	94	ABG01962	2	Phosphoenolpyruvate carboxylase [ <i>Sesuvium portulacastrum</i> ]	1e-113
47	78	P25826	3	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain precursor (RuBisCO large subunit) [ <i>Alluaudia procera</i> ]	1e-110
48	85	BAA19578	1	Water-soluble chlorophyll protein precursor [ <i>Lepidium virginicum</i> ]	0.35
49	96	YP_636295	2	Photosystem II CP43 chlorophyll apoprotein [ <i>Eucalyptus globules</i> subsp. <i>Globules</i> ]	0.0
50	113	AAB81104	1	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase [ <i>Spinacia oleracea</i> ]	1e-39
51	119	AAP83930	1	Rubisco activase beta form precursor [ <i>Larrea tridentata</i> ]	3e-46
52	123	CAA45523	1	Photosystem I light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein [ <i>Nicotiana tabacum</i> ]	3e-37
53	134	NP_176347	1	LHCA3*1; chlorophyll binding [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	1e-57
7 Photorespiration					
54	52	NP_200168	1	ATB5-A (cytochrome b5A) [ <i>Arabidopsis thaliana</i> ]	5e-23
55	79	AAO73867	1	Putative NADH-dependent hydroxypyruvate reductase [ <i>Glycine max</i> ]	2e-68
8 Stress					
56	29	BAC77693	1	Salt-induced hydrophilic protein [ <i>Atriplex nummularia</i> ]	0.95
57	36	BAA35121	4	DnaJ homolog [ <i>Salix gilgiana</i> ]	7e-26

	51	BAA35121	1	DnaJ homolog [Salix gilgiana]	3e-57
58	64	AAL26889	2	Abscisic stress ripening-like protein [Prunus persica]	5.6
59	67	BAC77694	2	Lipid transfer protein [Atriplex nummularia]	3e-34
60	77	AAG34818	1	Glutathione S-transferase GST 10 [Zea mays]	3e-51
61	81	AAL71857	1	Dehydroascorbate reductase [Nicotiana tabacum]	8e-06
62	90	AAX84944	1	Non-specific lipid transfer protein-like antimicrobial protein [Leonurus japonicus]	2e-18
63	102	AAF23459	1	Non-specific lipid transfer protein precursor [Capsicum annuum]	0.006
64	116	ABA98955	1	Prefoldin subunit 3, putative, expressed [Oryza sativa]	6e-38
65	121	CAA67070	1	Delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase [Medicago sativa]	2e-33
66	128	P31542	1	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA homolog CD4B, chloroplast precursor [Lycopersicon esculentum]	2e-56
9 Other					
67	69	AAG51035	1	Actin-like protein; 86009-89485 [Arabidopsis thaliana]	1e-39
68	105	CAD27718	1	putative vacuolar ATPase subunit 100 kDa subunit [Mesembryanthemum crystallinum]	3e-33
69	108	AAQ96375	1	60S ribosomal protein L13 [Solanum brevidens]	8e-33
70	112	NP_195639	1	ATP binding / phenylalanine-tRNA ligase [Arabidopsis thaliana]	2e-79
71	124	ABA94376	1	Leucine Rich Repeat family protein, expressed [Oryza sativa]	4.0
72	126	AAM91414	1	AT5g49230/K21P3_11 [Arabidopsis thaliana]	2e-24
73	129	AAX84677	1	auxin-repressed protein-like protein ARP1 [Manihot esculenta]	2e-26
74	40	AAM63110	3	F-box protein AtFBL5 [Arabidopsis thaliana]	7e-77

10 Unclassified proteins

75	1	ABE87179	33	Hypothetical MtrDRAFT_AC151668g27v1 truncatula]	protein [Medicago	1e-43
76	17	NP_564561	1	unknown protein [Arabidopsis thaliana]		1e-23
77	19	NP_182134	1	unknown protein [Arabidopsis thaliana]		2e-61
78	20	ZP_01342224	3	hypothetical protein [Lactobacillus gasseri ATCC 33323]	Lgas_03000343	3e-16
79	22	NP_187889	1	unknown protein [Arabidopsis thaliana]		3e-27
80	25	XP_470153	1	unknown protein [Oryza sativa]		0.049
81	27	NP_563682	1	unknown protein [Arabidopsis thaliana]		2e-23
82	28	NP_566108	1	unknown protein [Arabidopsis thaliana]		2e-61
83	42	NP_200466	1	unknown protein [Arabidopsis thaliana]		0.041
84	43	XP_388189	1	hypothetical protein FG08013.1 PH-1]	[Gibberella zeae	0.057
85	71	CAN60966	1	hypothetical protein [Vitis vinifera]		5e-16
86	72	NP_173069	1	unknown protein [Arabidopsis thaliana]		3e-25
87	84	NP_921903	2	hypothetical protein [Oryza sativa (japonica cultivar-group)]		5e-25
88	95	NP_567210	1	unknown protein [Arabidopsis thaliana]		2e-07
89	99	EAY88468	2	hypothetical protein OsI_009701 (indica cultivar-group)]	[Oryza sativa	0.032
90	100	YP_636358	1	hypothetical protein EuglgICp084 globulus subsp. globulus]	[Eucalyptus	2e-11
91	103	AAV44205	1	unknow protein [Oryza sativa (japonica cultivar- group)]		2e-32
92	122	NP_683487	1	unknown protein [Arabidopsis thaliana]		0.001
93	125	CAH59414	1	hypothetical protein [Plantago major]		2e-31
94	131	AAF09840	1	hypothetical protein [Deinococcus radiodurans R1]		1e-25

95	82	XP_663231	1	hypothetical protein AN5627.2 [Aspergillus nidulans FGSC A4]	0.045
96	140	EAU80205	1	predicted protein [Coprinopsis cinerea okayama7#130]	0.032
97	135		1	No significant similarity found	
98	137		1	No significant similarity found	
99	5		3	No significant similarity found	
100	8		1	No significant similarity found	
101	9		1	No significant similarity found	
102	12		4	No significant similarity found	
103	13		1	No significant similarity found	
104	23		2	No significant similarity found	
105	24		1	No significant similarity found	
106	26		1	No significant similarity found	
107	31		1	No significant similarity found	
108	47		2	No significant similarity found	
109	66		1	No significant similarity found	
110	70		1	No significant similarity found	
111	83		1	No significant similarity found	
112	86		1	No significant similarity found	
113	92		1	No significant similarity found	
114	93		5	No significant similarity found	



115	97	2	No significant similarity found
116	98	2	No significant similarity found
117	104	1	No significant similarity found
118	107	1	No significant similarity found
119	114	1	No significant similarity found
120	118	1	No significant similarity found
121	120	1	No significant similarity found
122	130	1	No significant similarity found

---

## 5.2 El estrés salino incrementa la expresión del gen *p5cs* e induce la acumulación de prolina en nopal.

En esta parte del trabajo se aisló un fragmento del marco de lectura abierto que corresponde a la delta 1-pirrolina-5-carboxilato sintetasa (*p5cs*) de *Opuntia streptacantha*. Este fragmento presenta una identidad del 90.4% con su homólogo en *Mesembryanthemum crystallinum*. Además se midió el contenido de prolina y clorofila y la actividad y el nivel de expresión de la *p5cs* en plantas jóvenes de *Opuntia streptacantha* tratadas con 0, 75, 150, 250 y 350 mM de cloruro de sodio durante 11 días. En general la acumulación de prolina incrementó con el aumento en la concentración de cloruro de sodio y los días de tratamiento. Los análisis de RT-PCR demostraron que el gen *Osp5cs* de *O. streptacantha* fue inducido por el estrés salino a los 9 y 11 días de tratamiento. Además se observó la inducción del gen *Osp5cs* por ABA en plantas jóvenes de *O. streptacantha*. A pesar de observar una correlación entre la sobre-expresión del transcrito y la acumulación de prolina bajo estrés salino, la actividad enzimática no correlacionó con estos resultados. En este trabajo sugerimos que la prolina posiblemente funciona como un osmolito para el ajuste osmótico intracelular y quizá juega un papel importante en la protección del aparato fotosintético en *O. streptacantha* en estrés salino.

Research article

# Salt stress increases the expression of *p5cs* gene and induces proline accumulation in cactus pear

Claudia O. Silva-Ortega<sup>a</sup>, Ana E. Ochoa-Alfaro<sup>a</sup>, Juan A. Reyes-Agüero<sup>b</sup>,  
Gerardo A. Aguado-Santacruz<sup>c</sup>, Juan F. Jiménez-Bremont<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> División de Biología Molecular, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, Camino a la Presa de San José 2055, Apartado Postal 3-74 Tangamanga, 78210 San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

<sup>b</sup> Instituto de Investigación en Zonas Desérticas, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Altair 200, Fracc. del Llano, 78377 San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

<sup>c</sup> Campo Experimental Bajío, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Km. 6.5 Carretera Celaya-San Miguel de Allende, 38110 Celaya, Guanajuato, Mexico

Received 19 May 2007

Available online 12 October 2007

## Abstract

Proline (Pro) is one of the most accumulated osmolytes in salinity and water deficit conditions in plants. In the present study, we measured the Pro content, the activity and the expression level of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS:  $\gamma$ -glutamyl kinase, EC 2.7.2.11 and glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase, EC 1.2.1.41), a key regulatory enzyme involved in the biosynthesis of Pro, in cactus pear (*Opuntia streptacantha*) subjected to 6, 9 and 11 days of salt stress. Treatment with NaCl of *O. streptacantha* young plants resulted in a decrease in the cladode thickness and root length, and in a significant and gradual accumulation of Pro in young cladodes, in a time- and concentration-dependent manner. P5CS activity, studied as  $\gamma$ -glutamyl kinase, was reduced at all times as a consequence of salt treatment, except at the sixth day at 75 and 150 mM of NaCl, where a slight increase was observed. We isolated an open reading frame (ORF) fragment of *p5cs* gene. The deduced amino acid sequence of the P5CS protein exhibited 90.4% of identity with the P5CS protein from *Mesembryanthemum crystallinum*. RT-PCR analysis revealed that the *Osp5cs* gene of *O. streptacantha* was induced by salt stress at 9 and 11 days of treatment. Furthermore, ABA-induced *Osp5cs* gene expression was observed in cladodes of cactus pear young plants. We observed an evident correlation between the transcript up-regulation and the Pro accumulation under salt stress; however, these results do not parallel with the changes in P5CS enzymatic activity. This Pro accumulation might function as an osmolyte for the intracellular osmotic adjustment and might be playing a critical role in protecting photosynthetic activity in *O. streptacantha* plants under salt stress.

© 2007 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

**Keywords:** Abscisic acid; Delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase; *Opuntia streptacantha*; Proline; Salt stress

## 1. Introduction

Salinity is considered a major factor in limiting plant development and productivity, mainly of important crops. Today,

*Abbreviations:* ABA, abscisic acid; ORF, open reading frame; *Osp5cs*, *Opuntia streptacantha* delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase; PCR, polymerase chain reaction; Pro, proline; P5CS, delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

\* Corresponding author. Tel.: +52 444 8 342000; fax: +52 444 8 342010.

E-mail address: [jbremont@ipicyt.edu.mx](mailto:jbremont@ipicyt.edu.mx) (J.F. Jiménez-Bremont).

there is increasing use of saline water in agriculture in arid and semiarid regions where the availability of fresh water is scarce. Saline stress causes inhibition of plant growth due to a reduction in water availability, sodium ion accumulation, and mineral imbalances, leading to cellular and molecular damage. Proline (Pro) is one of the most accumulated osmolytes found in plants with salinity and water deficit conditions [8,21,44]. Pro acts as osmoprotectant, it can also function as a protein stabilizer, it functions as a hydroxyl radical scavenger, stabilizes cell membranes by interacting with phospholipids,

and serves as a source of carbon and nitrogen [22]. In plants, Pro biosynthesis occurs via two pathways from either glutamate or ornithine; however, Pro biosynthesis from glutamate appears to be the predominant pathway, especially under stress conditions [8]. The key enzyme delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS:  $\gamma$ -glutamyl kinase, EC 2.7.2.11; glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase, EC 1.2.1.41) catalyses the first two steps of Pro biosynthesis from glutamate in plants [19]. *p5cs* gene has been isolated from several plants [11,14,19,20,38] and the correlation between the induction of *p5cs* gene and the accumulation of Pro has been shown in *Arabidopsis thaliana* and rice [20,46].

The finding that abiotic stress increases the accumulation of Pro in numerous plant species, together with the demonstration that it is possible to enhance osmotic stress tolerance in plants by Pro overproduction [39], gave us the motivation for the isolation and analysis of *Opuntia streptacantha* delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (*Osp5cs*) gene in Cactaceae, like *Opuntia*.

*Opuntia* spp. has become important in the semiarid areas of Mexico, where it plays a strategic role in subsistence agriculture [32]. Cactus pear is edible as a fruit and vegetable, and also is planted as an ornamental and a forage crop. As a crassulacean acid metabolism plant, *Opuntia* spp. is characterized by high water use efficiency. Because of this and its tolerance to drought, this plant can adapt to a variety of climatic conditions; therefore it has been cultivated in the arid and semiarid regions of many countries [24]. On the other hand, *Opuntia* species are sensitive to salinity [2,13,28,29,42]. The accumulation of osmolytes in *Opuntia* under abiotic stress is little known; only a few reports have been documented [9,31,10]. In *Opuntia megacantha* submitted to heat stress (37 and 47 °C) the Pro content increased as a response to this stress condition [9]. In *Opuntia ficus-indica* and *Opuntia humifusa* submitted to low temperatures a general increase in cladode concentrations of putative cryoprotectants such as fructose, glucose, sucrose, mannitol, sorbitol, and total amino acids including Pro was observed [31]. In cladodes and roots of *O. ficus-indica*, a slight increase in Pro content at 150 mM NaCl was recently reported [10].

Nevertheless, it is not known if Pro accumulation under abiotic stress in cactus pear correlates with the *p5cs* transcript induction. For the above reasons, the objective of the present investigation was to determine the content of Pro under salt stress in *O. streptacantha*, and to establish the relationship between the Pro accumulation, the P5CS activity and the expression of *Osp5cs* gene. Based on previous reports, where the abscisic acid (ABA) treatment increased *p5cs* transcript in *A. thaliana* and rice [20,41,46], we considered the possibility that the *Osp5cs* might be regulated by ABA, and so an additional aim was to determine if this gene was regulated.

## 2. Results and discussion

To determine whether the *p5cs* gene encoding the P5CS enzyme and the Pro content are affected in the salt stress response in *O. streptacantha*, cactus pear young plants of 9

weeks old were treated with 0, 75, 150, 250 and 350 mM NaCl for a period of 11 days. In addition, some physiological parameters were evaluated: cladode length, cladode thickness and root length at 0, 6, 9 and 11 days of treatment with NaCl.

### 2.1. Salt stress effect on cladode thickness and root length

No visible damage was observed in the stressed young plants except for a pronounced decrease in succulence, which resulted in flaccid cladodes at 9 days of stress at 350 mM NaCl, and at 250 and 350 mM NaCl at 11 days of stress (Fig. 1C, 1–4). Cladode growth, measured as total length, did not show significant changes (data not shown) due to the short period of salt stress. The growth reduction is a characteristic of salt sensitive plants and has been shown in *Opuntia* submitted to months of salt stress [10,28,29]. We observed a decrease of about 25% in cladode thickness of the young plants that were treated with the higher concentrations (250 and 350 mM) of NaCl during the complete period in comparison to the control cladodes (Fig. 1A). In addition, the root length showed a considerable decrease under salt stress. At the ninth day of stress at 75 and 150 mM NaCl, a 45% decrease in root length was observed, while at 250 and 350 mM NaCl, a decrease of 30% was observed from the beginning of the sixth day of stress (Fig. 1B). Silverman et al. [42] showed that the application of NaCl in two populations of *O. humifusa* (with 50 mM increments up to 400 mM) every 3 days for 6 weeks caused the cladodes to decrease up to 30% in thickness. The same effect was observed in *O. ficus-indica* where cladode thickness decreased with increasing salinity [28]. With regard to the root physiology, a rapid and transient reduction in growth rates has been documented after sudden increase in NaCl [34]. Root growth of agaves and cacti is drastically inhibited by saline stress [30], specifically in the *Opuntia* genus the reduction in the root length has already been reported, for example in *O. humifusa* and *O. ficus-indica* the root length was significantly affected by salinity [28,42]. Gersani et al. [13] reported that in *O. ficus-indica* roots exposed to 30 and 100 mM NaCl for 28 days, cortical cells became shorter and lateral root development was substantially reduced as salinity was increased. The diminution in cladode thickness and root length showed in this work suggests that the *O. streptacantha* plants are affected by saline stress; moreover the marked decrease in succulence, as a consequence of water reduction in response to salinity, possibly indicates that the *O. streptacantha* young plants are under osmotic stress, suggesting the possibility of the accumulation of compatible osmolytes such as Pro, to act as osmoprotectant and take part in the osmotic adjustment.

### 2.2. Effect of salt stress on the proline content

Pro content in young cladodes of *O. streptacantha* plants treated with 0, 75, 150, 250 and 350 mM NaCl during 11 days is shown in Fig. 2. In general Pro accumulation increased gradually with rising concentration of NaCl and days of

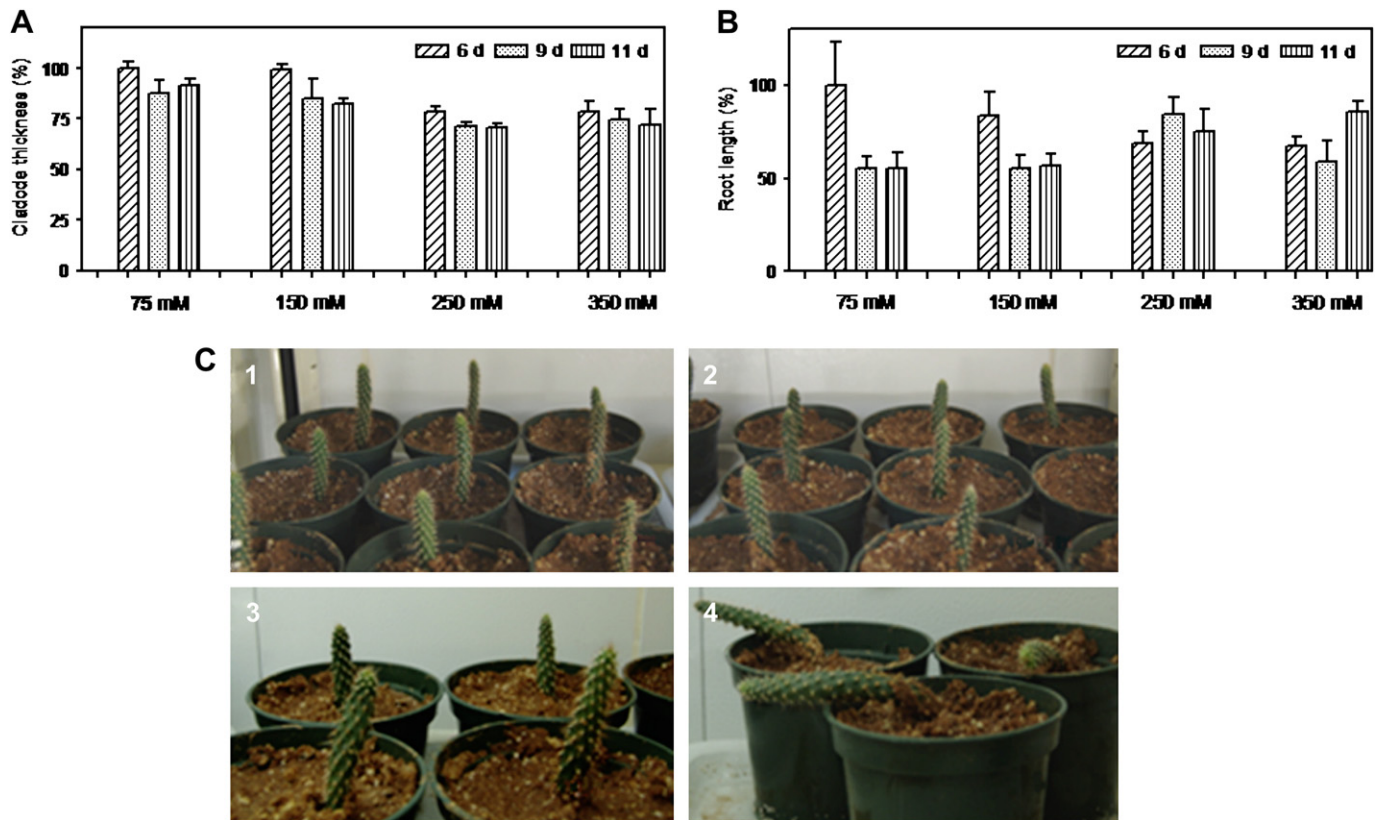


Fig. 1. Effect of salt stress in 9-week-old *Opuntia streptacantha* young plants. Percentage of (A) cladode thickness and (B) root length of plants subject to 75, 150, 250 and 350 mM NaCl during 6, 9 and 11 days. The reduction in the percentage of cladode thickness and root length of salt stressed plants was calculated according to 100% of the control plants. Data are mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . (C) Photographs of *Opuntia streptacantha* plants at 0 (1), 6 (2), 9 (3) and 11 (4) days of treatment with 350 mM NaCl.

treatment. At 6 days of stress the major increase (fivefold) in the Pro content in young cladodes was observed at 350 mM NaCl, in comparison to the non-treated cladodes. At 9 days of treatment the Pro accumulation was significantly stimulated

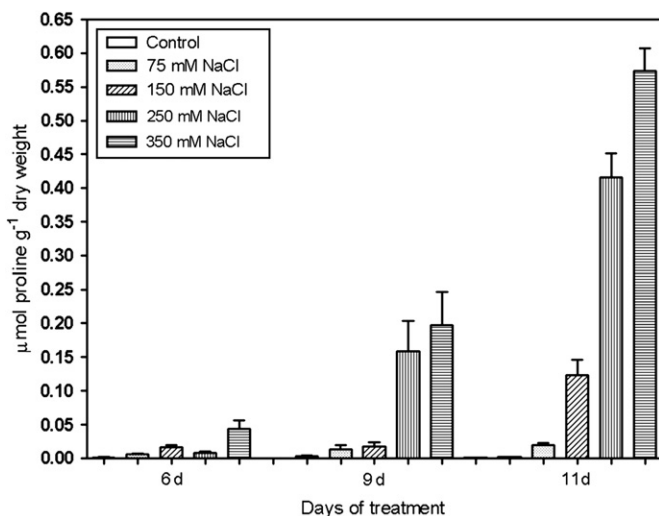


Fig. 2. Proline content in cladodes of *Opuntia streptacantha* young plants subjected to 0 (control), 75, 150, 250 and 350 mM NaCl during 6, 9 and 11 days. Data are mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

at the high concentrations (250 and 350 mM NaCl); being approximately 15- and 20-fold to the control. At 11 days of stress the Pro accumulation in control cladodes was almost undetectable, and the most significant accumulation (20- and 30-fold) was found at 250 and 350 mM NaCl compared to the cladodes treated with 150 mM NaCl (Fig. 2). Environmental stresses such as high salt, low water availability, and low temperature can induce the accumulation of one or several compatible solutes such as Pro, glycinebetaine, polyols or sugars in plants [8,33]. Cacti family includes many species that occupy extreme habitats and produce many compounds that probably can confer tolerance to those environments; for example, anthocyanins are replaced for betalains [4]. Pro accumulation in drought and salinity stress in *Opuntia* species is a not very explored field. In *O. megacantha* cultivars exposed to heat stress, an increase in the Pro concentration in one of the cultivars at 47 °C, approximately twofold with regard to the control, was reported [9]. In *O. ficus-indica* Pro content was measured in basal and apical cladodes and roots. A slight increase in the amount of Pro at the highest concentration of NaCl (150 mM) was observed in the cladode as well as in the roots [10]. Pro interacts with enzymes to preserve protein structure and activities due to its characteristic of forming hydrophilic colloids in aqueous media with a hydrophobic backbone interacting with the protein [5]. For example, it has been



shown that Pro reduces in vitro enzyme denaturalization caused by heat and NaCl stress [16]. Our results, together with other reports, suggest that the Pro increase observed under salt stress conditions in *Opuntia* might function as a source of solute for intracellular osmotic adjustments in salt stress response.

### 2.3. Isolation and sequence analysis of an open reading frame (ORF) fragment corresponding to *O. streptacantha* delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene

Plant P5CS sequences have highly conserved regions and thus provide several candidate sites for designing PCR primers of consensus sequence in order to clone related genes in a plant of our interest. Nested amplifications by PCR were carried out using three primers to obtain a partial cDNA sequence encoding P5CS from *O. streptacantha*. First amplification with primers 71 and 72 gave rise to a smear. A second nested amplification with primer 73, instead of 72, produced a single band of 1401 bp corresponding to an ORF fragment of *Osp5cs* from *Opuntia*. The sequence obtained (Fig. 3) was registered at the GenBank (GenBank accession no. EF527256) and it corresponds to all of the amino acids from 85 to 551 of the *Mesembryanthemum crystallinum* protein, which has 719 amino acids. We compared the partial cDNA sequence of the *O. streptacantha* P5CS reported in this work using *Clustal* analysis with the corresponding sequences reported from other plant P5CSs as observed in Fig. 3. The highest identity was to *M. crystallinum* with 90.4% (GenBank accession no. O65361), *Vitis vinifera* with 81.4% (GenBank accession no. CAB40834), *A. thaliana* with 78.8% (GenBank accession no. NP\_181510) and *Oryza sativa* with 78.4% (GenBank accession no. BAA19916). A phylogenetic tree of P5CS from different plant species was constructed using MEGA 3.1 version [23] (Fig. 4). As expected, the highest homology was found with the *M. crystallinum* facultative halophyte, because this plant as well as the cactus pear belongs to the Caryophyllales order.

### 2.4. Differential expression of *O. streptacantha* delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene under salt stress conditions

In order to determine whether induction of Pro accumulation by salt stress in cactus pear cladodes correlates with transcriptional regulation, *Osp5cs* transcript level was assessed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), using the same samples as those described above for Pro analysis. In order to carry out a RT-PCR analysis, we amplified an actin cDNA fragment (see Section 4) of 630 bp corresponding to an ORF fragment of *actin* from *Opuntia*, to use it as a loading control. The sequence obtained was registered at the GenBank (GenBank accession no. EF527257). As shown in Fig. 5, at 6 days of stress the *Osp5cs* gene did not show changes in its expression. However, at 9 days of treatment, we observed that the *Osp5cs* gene was gradually up-regulated with increase in concentration of NaCl. In addition, at 11 days of stress, the

major transcript accumulation was observed at 250 mM NaCl (Fig. 5). At 9 days of stress there was evident correlation between the transcript up-regulation and the Pro accumulation with increase in NaCl concentration. The same effect was observed at 11 days of treatment, up to 250 mM NaCl. In *A. thaliana* and rice the gene encoding for P5CS was induced by high salt and dehydration, and the simultaneous accumulation of Pro was observed as a result of both of the previous treatments in *A. thaliana* [46]. However, unlike in *A. thaliana* the accumulation of Pro in rice was observed only as a result of high salt treatment [20].

The increase in the Pro content can be due to de novo synthesis, reduction in the rate of proteins' synthesis and/or proteins' degradation. The finding that the salt stress induces the *Osp5cs* gene, that encodes for the key enzyme P5CS, which catalyses the first two steps of Pro biosynthesis from glutamate in plants, suggests that the Pro accumulation is due to the de novo synthesis without discarding other possibilities like diminution in the rate of proteins' synthesis and/or proteins' degradation.

### 2.5. Effect of abscisic acid on expression of *O. streptacantha* delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene

In order to characterize the response of *Osp5cs* gene to ABA, we examined the effect of this plant growth regulator in 9-week-old *O. streptacantha* young plants by applying 0, 0.1 and 100  $\mu$ M ABA in Hoagland's nutrient solution under light condition during 1.5 h by RT-PCR analysis (Fig. 6). Interestingly, the *Osp5cs* gene was regulated at the transcriptional level by 0.1 and 100  $\mu$ M ABA treatments. Lower concentration of ABA (0.1  $\mu$ M) induced the highest accumulation of the *Osp5cs* transcript in comparison to the non-treated control (Fig. 6). ABA has long been known to be a mediator in triggering plant responses to various environmental stresses, particularly drought and salinity. It also affects the patterns of expression of more than 1000 genes in a full-length cDNA microarray of around 7000 genes in *A. thaliana* [41]. In *A. thaliana* and rice it was found that the expression of *p5cs* is up-regulated by ABA [20,46]. With respect to cactus pear plants, it was demonstrated that the exogenous ABA application in *O. ficus-indica* (cold sensitive plant) and *Opuntia fragilis* (cold tolerant plant) increased the cold stress tolerance and that this effect accentuates in *O. fragilis* [26]. However, there are no studies on the effect of ABA in the transcriptional regulation of those genes involved in the osmolite biosynthesis in cactus pear. Our data reveal that in *O. streptacantha*, ABA is an *Osp5cs* gene inductor. It is important, since ABA is one of the main components of the signaling pathway during abiotic stress.

### 2.6. Effect of salt stress on the delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) activity

P5CS activity, studied as  $\gamma$ -glutamyl kinase, in the same stressed cladodes of *O. streptacantha* plants as those described

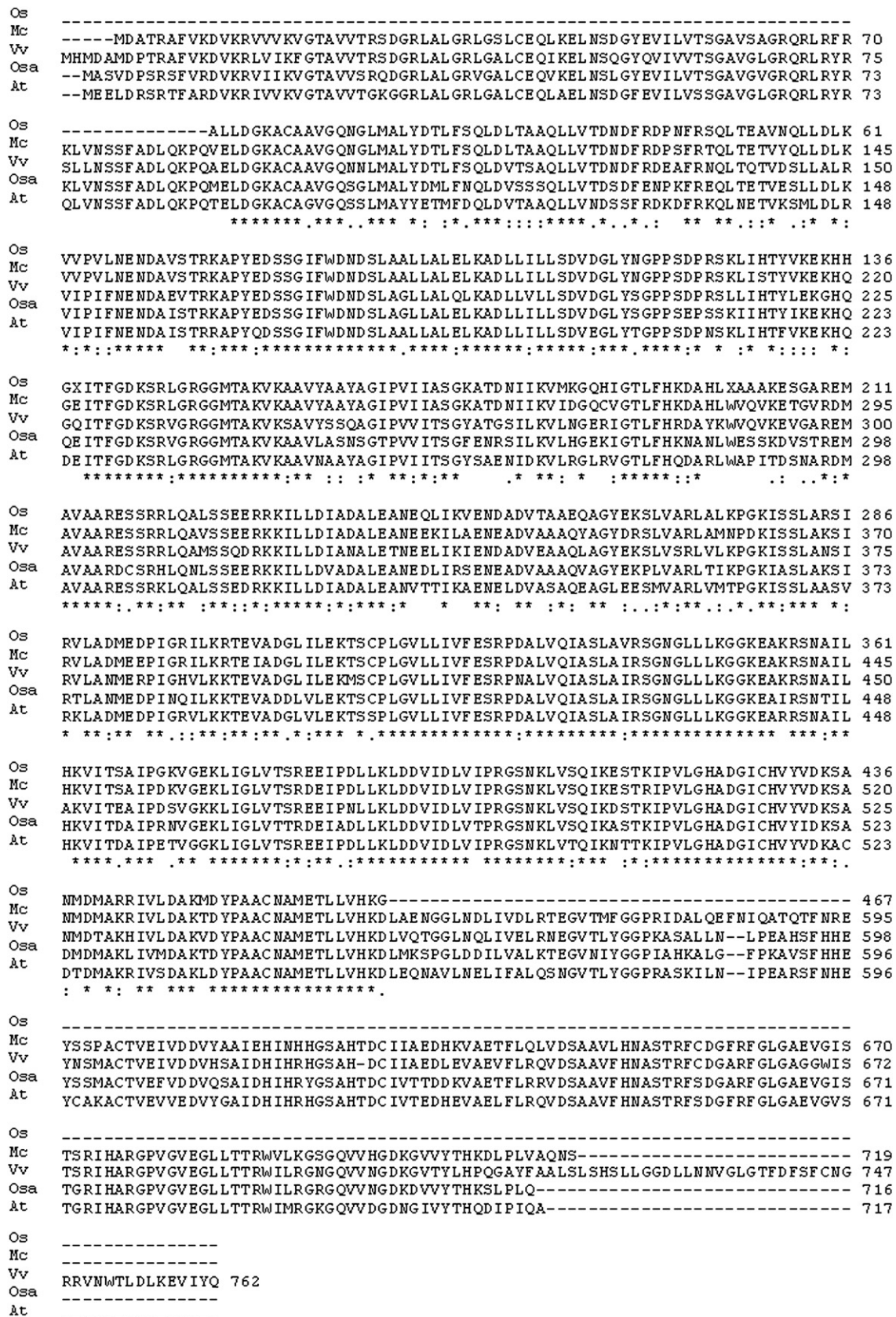


Fig. 3. Multiple amino acid alignment as derived by maximal identity of P5CS fragment from the *Opuntia streptacantha* (Os) with the corresponding protein sequences of other plant P5CSs: Mc, *Mesembryanthemum crystallinum* (GenBank accession no. O65361); Vv, *Vitis vinifera* (GenBank accession no. CAB40834); Osa, *Oryza sativa* (GenBank accession no. BAA19916) and At, *Arabidopsis thaliana* (GenBank accession no. NP\_181510). Identical residues (asterisk) in the five proteins and conserved amino acid substitutions (dots) are indicated. Dashes show gaps in the amino acid sequences introduced to optimize alignment.

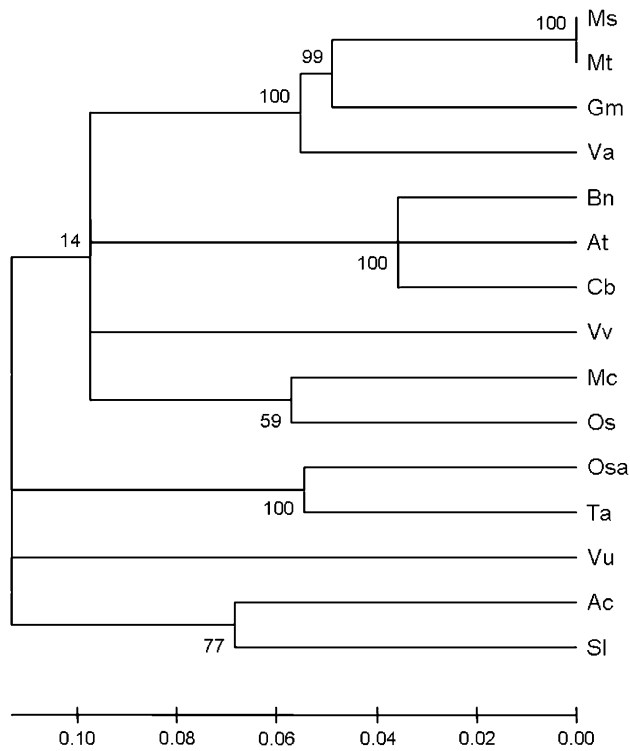


Fig. 4. Phylogenetic dendrograms of delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase of Ms, *Medicago sativa* (GenBank accession no. CAA67069); Mt, *Medicago truncatula* (GenBank accession no. CAC82184); Gm, *Glycine max* (GenBank accession no. AAR86688); Va, *Vigna aconitifolia* (GenBank accession no. P32296); Bn, *Brassica napus* (GenBank accession no. AAK01361); At, *Arabidopsis thaliana* (GenBank accession no. NP\_181510); Cb, *Chorisporea bungeana* (GenBank accession no. AAV67896); Vv, *Vitis vinifera* (GenBank accession no. CAB40834); Mc, *Mesembryanthemum crystallinum* (GenBank accession no. O65361); Os, *Opuntia streptacantha* (GenBank accession no. EF527256); Osa, *Oryza sativa* (GenBank accession no. BAA19916); Ta, *Triticum aestivum* (GenBank accession no. BAD97364); Vu, *Vigna unguiculata* (GenBank accession no. BAB33037); Ac, *Actinidia chinensis* (GenBank accession no. O04015) and Sl, *Solanum lycopersicum* (GenBank accession no. Q96480). Construction of the phylogenetic tree and bootstrap analysis (1000 replicates) were performed with MEGA 3.1 version.

above for Pro analysis is shown in Fig. 7. We observed that the cactus pear plants have a tendency to maintain or mainly to reduce the P5CS activity as a consequence of salt treatment, except for the sixth day at the lower NaCl concentrations (75 and 150 mM), where a slight increase was observed. The reduction in the P5CS activity was more notable at 9 days of stress with regard to the control. In spite of the fact that at 9 and 11 days of salt stress *O. streptacantha* young plants treated with NaCl showed minor P5CS activity, they accumulated the major amount of Pro. Our result is in agreement with previous studies on aquatic macrophytes and wheat. Rout and Shaw [37] reported that in aquatic macrophyte *Hydrilla verticillata* the Pro levels in response to salt stress were increased nearly three-fold, while the activity of the P5CS enzyme remained nearly unchanged. In leaves of wheat exposed to salt stress at 150 and 300 mM NaCl a significant increase in Pro content was found, however, the P5CS activity remained unchanged [48]. Nevertheless, other authors have reported that the P5CS activity increases in response to salinity [19,47]. Our results

suggest that it is possible that salt stress only induces the synthesis and/or stabilization of *Osp5cs* transcript without leading to an increase in the activity of P5CS enzyme. Pro is synthesized from glutamate by two successive reductions, which are

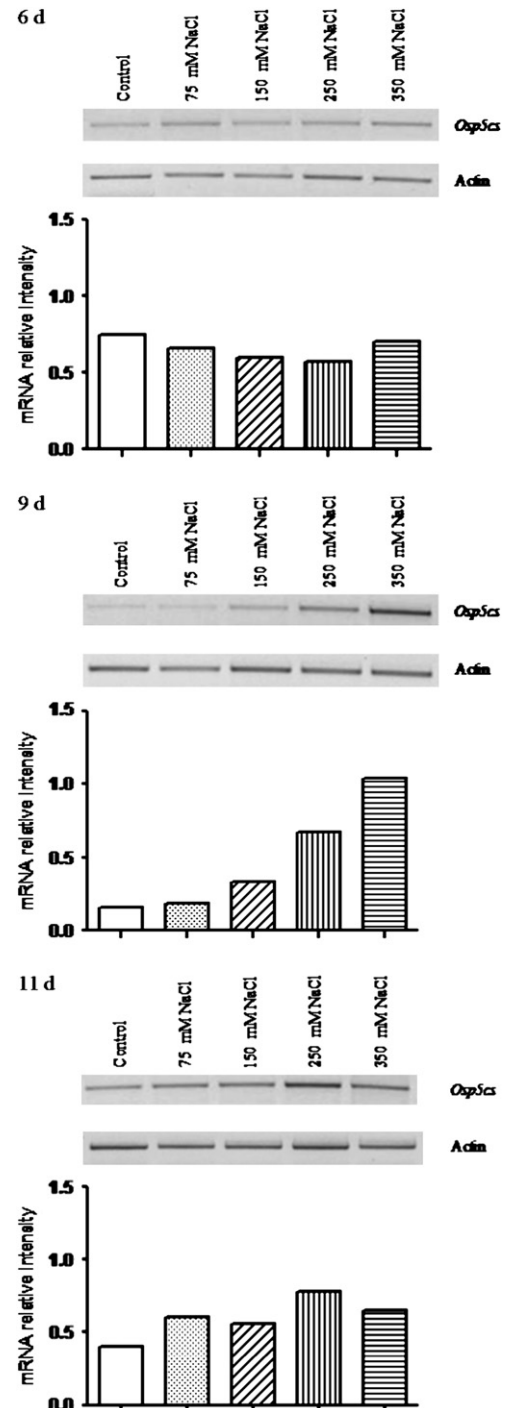


Fig. 5. Effect of salt stress on *Osp5cs* expression in cactus pear. Total RNA was isolated from young cladodes of 9-week-old *Opuntia streptacantha* plants subjected to 6, 9 and 11 days to different concentrations of NaCl (0, 75, 150, 250 and 350 mM). Each RNA sample (1  $\mu$ g) was used for RT-PCR analyses. RT-PCR product (15  $\mu$ L) was loaded on each lane and separated by electrophoresis on 1% (w/v) agarose gel. As loading control the actin product was used. The histogram shows relative *Osp5cs* cDNA's abundance after normalization with the actin signal.



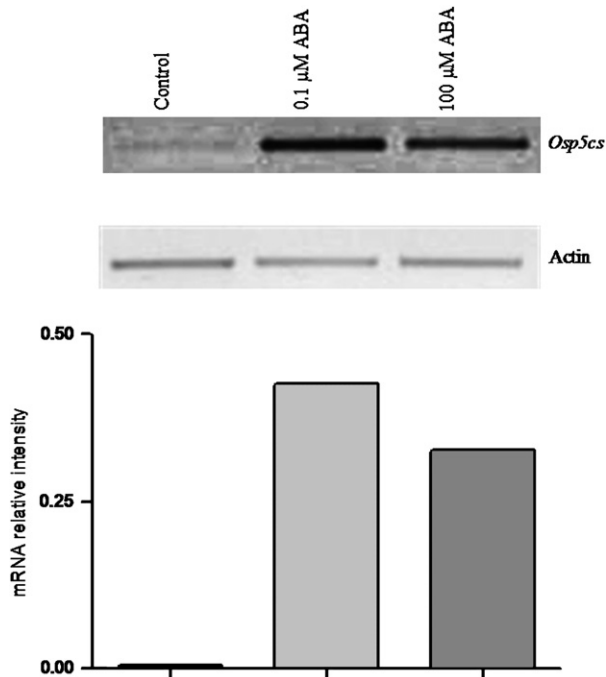


Fig. 6. Effect of ABA on the expression of the *Osp5cs* gene in cactus pear. Total RNA was isolated from young cladodes of 12-week-old *Opuntia streptacantha* plants subjected to 0 (control), 0.1 and 100  $\mu\text{M}$  ABA during 1.5 h. Each RNA sample (1  $\mu\text{g}$ ) was used for RT-PCR analyses. RT-PCR product (25  $\mu\text{L}$ ) was loaded on each lane and separated by electrophoresis on 1% (w/v) agarose gel. As loading control the actin product was used. The histogram shows relative *Osp5cs* cDNA's abundance after normalization with the actin signal.

catalyzed by P5CS and pyrroline-5-carboxylate reductase (EC 1.5.1.2) [8]. In leaves of wheat an increase in the pyrroline-5-carboxylate reductase activity and Pro content by high salinity was observed, however, the P5CS activity did not show a specific response to salinity. The authors suggest that pyrroline-5-carboxylate reductase might be the rate-limiting factor in Pro synthesis from glutamate at high salinity [48]. It would be interesting to measure the pyrroline-5-carboxylate reductase activity to know the participation of this enzyme in Pro biosynthesis in *O. streptacantha* under salt stress.

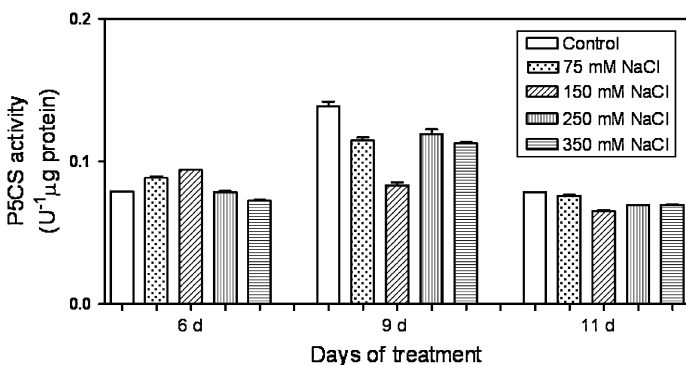


Fig. 7. Activity of P5CS ( $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase;  $\text{U } \mu\text{g}^{-1}$  protein), assayed as  $\gamma$ -glutamyl kinase, in cladodes of *Opuntia streptacantha* young plants after treatment with 0 (control), 75, 150, 250 and 350 mM NaCl during 6, 9 and 11 days. Data are mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

## 2.7. Salt stress effect on cladode chlorophyll content

Chlorophyll content is fundamental to understand the plant response to the environment in which it resides. To know if plants are damaged in the photosynthetic metabolism as a consequence of salt stress we decided to measure the cladode total chlorophyll content in the same stressed cactus pears as those described above for Pro analysis. Chlorophyll content measured in the young cladodes at 6 days of salt stress showed an increase of four and sevenfold approximately at 75 and 150 mM NaCl, respectively, compared to the control, while at 250 and 350 mM NaCl the increase was less being this of one and fourfold, respectively (Fig. 8). At 9 and 11 days of treatment the increase in chlorophyll content was increasing proportionally with the NaCl concentration. The most important augment in chlorophyll content was sixfold at 250 mM NaCl (9 days) and fivefold at 350 mM NaCl (11 days) (Fig. 8). Changes in leaf chlorophyll content can be used as an indicator of maximum photosynthetic capacity, leaf developmental stage, productivity and stress [7,15,25]. In salt susceptible plants such as tomato, potato, pea, and bean a decrease in the chlorophyll content has been shown [43]. On the other hand, the increase in the chlorophyll content during salt stress has previously been reported; for example, the chlorophyll content increased in *Amaranthus tricolor* treated with 300 mM NaCl for 7 days [45]. Our results show that in *O. streptacantha* the chlorophyll content increases rather than to reduce. Also graminaceous chlorophyll cells subjected to osmotic stress developed substantially higher amounts of chlorophyll [12]. The increased chlorophyll accumulation in response to abiotic stress could be due to chloroplast development or to increased thylakoid number, as it has been reported [6,12]. On the other hand, compatible solutes play an important role in preventing thylakoid membrane damage during dehydration [40]. As Pro functions as a protein stabilizer, we suggest that the Pro might be protecting enzymes involved in the chlorophyll biosynthesis from stress

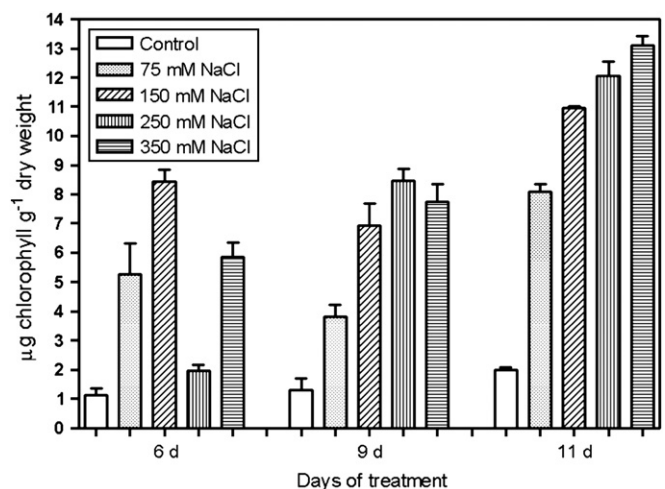


Fig. 8. Chlorophyll content in cladodes of *Opuntia streptacantha* young plants subject to 0 (control), 75, 150, 250 and 350 mM NaCl during 6, 9 and 11 days. Data are mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

conditions. We also suggest that the high Pro levels in *O. streptacantha* under salt stress could be involved in maintaining chlorophyll levels and the turgor.

### 3. Conclusion

In the present study, we have found Pro accumulation and transcriptional regulation of *Osp5cs* gene by salt stress. Due to the significant accumulation of Pro in *O. streptacantha* under salt stress, we suggest that the Pro might be a source of solute for intracellular osmotic adjustments. We observed an evident correlation between the transcript up-regulation and the Pro accumulation under salt stress; however, these results do not parallel with the changes in P5CS enzymatic activity. It is possible that salt stress only induces the synthesis and/or stabilization of *Osp5cs* transcript without leading to an increase in the activity of P5CS enzyme. In addition, ABA induces *Osp5cs* gene expression, and ABA signaling might mediate the regulation of this gene under stress. Finally, Pro might be playing a critical role in the turgor maintenance and protecting photosynthetic activity in *Opuntia* plants.

### 4. Methods

#### 4.1. Plant materials and growth conditions

The *Opuntia* seeds gathered were taken from *O. streptacantha* cactus pears. The plant was growing in the semiarid region of Villa de Zaragoza in the state of San Luis Potosí, México. Mature cladodes of this plant were prepared as specimen and were deposited in the herbarium of the Autonomous University of San Luis Potosí. The seeds were washed and put to dry for 24 h. With the purpose to break the seeds latency, they were stored during 6 months at 25 °C [36]. Then they were placed in a seed germination bed in a growth chamber at 25 °C under 12 h (150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) light and 12 h dark cycle. Emerging young plants were transferred to a Hoagland solution for 1 week to allow their adaptation before starting with the salt stress experiments.

#### 4.2. Salt stress treatment

Nine-week-old *O. streptacantha* young plants with a cladode of an average length of  $9.0 \pm 0.5$  cm were transferred to a perlite/sand support in semihydroponic conditions. Salt stress was imposed by application of the Hoagland nutrient solution [18] containing 0, 75, 150, 250 and 350 mM NaCl during 6, 9 and 11 days. After each salt treatment, young cladodes were transferred to liquid nitrogen for subsequent total RNA isolation, and estimation of Pro and total chlorophyll contents.

#### 4.3. ABA treatment

Twelve-week-old *O. streptacantha* young plants with a cladode of an average length of  $10.5 \pm 0.5$  cm were transferred to a perlite/sand support in semihydroponic conditions. ABA treatment was imposed by application of the Hoagland

nutrient solution [18] containing 0, 0.1 and 100  $\mu\text{M}$  ABA under light conditions during 1.5 h. After treatments, young cladodes were frozen in liquid nitrogen for subsequent total RNA isolation.

#### 4.4. Cladode thickness and root length

Cladode length, cladode thickness and root length for each group of cactus pear young plants at 0, 6, 9 and 11 days of treatment in all the used NaCl concentrations were measured with a caliper to check for possible morphological differences. Measurements of control young plants in centimeter were considered to be 100%. To determine the percentage of the cladode length and thickness, and root length of the salt stress plants we used the following formula: % of cladode length or thickness or root length = (cm stress plant/cm control plant)  $\times$  100%.

#### 4.5. Proline content

Free Pro was extracted by boiling 0.5 g of plant material in 2 mL of distilled water. Then 500  $\mu\text{L}$  of 0.2 mM sodium citrate (pH 4.6) and 2 mL of 1% ninhydrin (acetic acid/water, 60/40, v/v) were added to 0.5  $\mu\text{L}$  of the plant extract. Mixture was boiled 1 h, 2 mL of toluene was added for the extraction and then centrifuged. Pro content was measured spectrophotometrically (Beckman Du-530, Fullerton, USA) at 520 nm following the ninhydrin method described by Magne and Larher [27], using pure Pro (Sigma–Aldrich, Missouri, USA) as the standard. All of the experiments were carried out in triplicates using cladodes from three different plants and the data represent the mean  $\pm$  SD.

#### 4.6. RNA isolation and cDNA synthesis

Total RNA was extracted from *O. streptacantha* cladodes with the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) as recommended by the manufacturer and treated with DNase I (Invitrogen, Carlsbad, USA). First-strand cDNA synthesis was performed in a total volume of 30  $\mu\text{L}$  with SuperScript™ First-Strand Synthesis System for reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR; Invitrogen, Carlsbad, USA). Each reaction mixture contained 1  $\mu\text{g}$  of total RNA, 0.3 mM dNTP mix, 0.5  $\mu\text{g}$  Oligo(dT)<sub>12–18</sub>, 20 mM Tris–HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01 mM dithiothreitol (DTT), 40 U of Recombinant Ribonuclease Inhibitor (RNase-OUT™), and 50 U of SuperScript™ II RT. Reaction mixtures were incubated at 42 °C for 50 min, then at 70 °C for 15 min, and finally with 1 U of *Escherichia coli* RNase H at 37 °C for 20 min to remove RNA templates from the cDNA:RNA hybrid molecules. A control reaction for each sample was performed simultaneously without reverse transcriptase.

#### 4.7. Osactin and *Osp5cs* ORF fragments' cloning and sequencing

Different sets of primers were designed to amplify each ORF fragment by RT-PCR: *actin* gene (GenBank accession

no. J01238) sense 5-Act 5'-AACTGGGATGACATGGAGAA-3' and antisense 3-Act 5'-ATCACACTTCATGATGGAGTTGTA-3' [35]. Primers (external or internal) of the *p5cs* gene were designed based on conserved regions of the corresponding enzymes from several plants. Nested PCR for the amplification of *Osp5cs* was started with the external primers 71 and 72 followed by further amplification using the external primer 71 and the internal primer 73. The primers synthesized to obtain the *Osp5cs* fragment were: 71 5'-CTTGATGGGAAAGCATGTGC-3' (sense), 72 5'-CCTCGAGCATGAATCCTACTT-3' (antisense) and 73 5'-GTGTACAAGAAGTGTTCATAGC-3' (antisense) from conserved regions of cDNAs from: *M. crystallinum* (GenBank accession no. O65361), *Suaeda salsa* (GenBank accession no. AAM28630), *V. vinifera* (GenBank accession no. CAB40834), *Glycine max* (GenBank accession no. AAR86688) and *Medicago sativa* (GenBank accession no. CAA67069). PCR amplifications were performed in a 50  $\mu$ L reaction mixture containing 1  $\mu$ L of the cDNA as template obtained by reverse transcription using RNA isolated from cladode, 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 125  $\mu$ M dNTPs, 0.2  $\mu$ M each primer and 2.5 U Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, USA). The PCR amplification conditions for *actin-1* gene were as follows: 5 min at 94 °C followed by 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 57 °C and finally 60 s at 72 °C, followed by 72 °C for 7 min, and for *Osp5cs* gene were as follows: 5 min at 94 °C followed by 30 cycles of 30 s at 94 °C, 60 s at 58 °C (nested PCR 1 *Osp5cs*) and 59 °C (nested PCR 2 *Osp5cs*) and finally 120 s at 72 °C, followed by 72 °C for 7 min. The samples were analyzed by electrophoresis on 0.8% agarose gels. Polymerase chain reaction (PCR) products of the expected size were cloned in the pCR4-TOPO vector (TOPO TA Cloning Kit, Invitrogen, Carlsbad, USA) and further sequenced with an ABI PRISM 377 DNA automated sequencer (Perkin-Elmer). Comparisons and protein sequence alignment were carried out using the ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) program. For the construction of the dendrogram we used MEGA 3.1 version [23].

#### 4.8. RT-PCR analyses of gene transcripts

Primers to amplify *Osp5cs* fragment by RT-PCR analyses were: 71 and 73. For synthesis of an actin fragment (loading control) the primers used were 5-Act and 3-Act. Equal RNA amounts were used for each RT-PCR of cladodes of *O. streptacantha* young plants treated with 0, 75, 150, 250 and 350 mM NaCl or treated with 0, 0.1 and 100  $\mu$ M ABA. PCR amplifications were performed in a 50  $\mu$ L reaction mixture containing 1  $\mu$ L of the RT reaction product as template. The PCR amplification conditions for *Osp5cs* gene were as follows: 5 min at 94 °C, 30 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 61 °C, 120 s at 72 °C and 7 min at 72 °C for the final extension. The PCR amplification conditions for *Osactin* gene were as follows: 5 min at 94 °C, 25 cycles of 30 s at 94 °C, 30 s at 57 °C, 60 s at 72 °C and 7 min at 72 °C for the final extension. Amplification was performed with different number of cycles to ensure a linear response in the PCR and was

made in duplicates for each condition. PCR products were electrophoretically separated in 1% agarose gel. Quantification of signals was performed by Doc-It<sup>®</sup>LS Image Analysis Software. Each signal was normalized to the actin signal. Densitometry analyses were made with the Doc-It<sup>®</sup>LS Image Analysis Software.

#### 4.9. P5CS activity assay

The activity of P5CS was assayed following the method described in Hayzer and Leisinger [17]. The extracts to measure the P5CS activity were obtained as follows: the cladodes were homogenized in an extraction buffer (pH 7.5, 100 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol, 4 mM DTT, 2 mM PMSF and 2% PVPP) in pre-chilled eppendorf tubes in a cold room. The extracts were centrifuged at 4 °C for 20 min at 10,000  $\times$  g. The supernatants were further clarified by centrifugation at 10,000  $\times$  g for 20 min at 4 °C. The activity of P5CS was determined as  $\gamma$ -glutamyl kinase in the enzyme extract by monitoring the formation of  $\gamma$ -glutamyl hydroxamate. The enzyme assay was carried out in a mixture contained the following in a final volume of 0.5 mL: Tris-HCl (50 mM, pH 7.0), 50 mM L-glutamate, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM hydroxylamine-HCl, 10 mM ATP and the enzyme extract. The reaction mixture was incubated at 37 °C for 15 min and was stopped by adding 1 mL of the stop buffer (2.5 g of FeCl<sub>3</sub> and 6 g of trichloroacetic acid in a final volume of 100 mL of 2.5 N HCl). The precipitated proteins were removed by centrifugation and the absorbance was read at 535 nm against a blank identical to the above but lacking ATP. The amount of  $\gamma$ -glutamyl hydroxamate complex produced was estimated from the molar extinction coefficient 250 mol<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> reported for Fe<sup>3+</sup> hydroxamate complex of the compound. The activity was expressed in U  $\mu$ g<sup>-1</sup> protein which represents the amount of enzyme required to produce 1  $\mu$ mol of  $\gamma$ -glutamyl hydroxamate min<sup>-1</sup>. Total protein content was determined according to Bradford method [3].

#### 4.10. Chlorophyll content

The photosynthetic pigment content of cladode was determined as described by Arnon [1]. Pigment was extracted in 80% cold acetone and the absorbance of the extract was measured spectrophotometrically (Beckman Du-530, Fullerton, USA) at 645 and 663 nm. All of the experiments were carried out in triplicates of cladode from three different plants and the data represent the mean  $\pm$  SD.

#### Acknowledgments

We thank members of the Laboratory of Plant Stress Molecular Biology at IPICYT Institute for critical review of the manuscript. This work was supported by the Fondo Sectorial de Investigación en Materias Agrícola, Pecuaria, Acuicultura, Agrobiotecnología y Recursos Fitogenéticos SAGARPA-CONACYT (Project 0216-SAGARPA).

## References

- [1] D.I. Arnon, Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*, *Plant Physiol.* 24 (1949) 1–15.
- [2] W.L. Berry, P.S. Nobel, Influence of soil and mineral stresses on cacti, *J. Plant Nutr.* 8 (1985) 679–696.
- [3] M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein–dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [4] A. Cronquist, *The Evolution and Classification of Flowering Plants*, second ed. New York Botanical Garden, Bronx, 1988.
- [5] S.V. Chadalavada, R.B.V.B. Rajendrakumar, A.R. Reddy, Proline–protein interactions: protection of structural and functional integrity of M<sub>4</sub> lactate dehydrogenase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201 (1994) 957–963.
- [6] C.-C. Chang, R.D. Locy, R. Smeda, S.V. Sahi, N.K. Singh, Photoautotrophic tobacco cells adapted to grow at high salinity, *Plant Cell Rep.* 16 (1997) 495–502.
- [7] P.J. Curran, J.L. Dungan, H.L. Gholz, Exploring the relationship between reflectance red edge and chlorophyll content in slash pine, *Tree Physiol.* 7 (1990) 33–48.
- [8] A.J. Delauney, D.P.S. Verma, Proline biosynthesis and osmoregulation in plants, *Plant J.* 4 (1993) 215–223.
- [9] A. Flores-Hernández, B. Murillo-Amador, J.L. García-Hernández, H.C. Fraga-Palomino, Concentración de prolina en brotes de cultivares de nopal (*Opuntia megacantha*) sometidos a estrés por calor, *Phyton.* 65 (2001) 15–24.
- [10] V.A. Franco-Salazar, J.A. Véliz, Respuestas de la tuna [*Opuntia ficus-indica* (L.) MILL.] al NaCl, *Interciencia* 32 (2007) 125–130.
- [11] T. Fujita, A. Maggio, M. Garcia-Rios, R.A. Bressan, L.N. Csonka, Comparative analysis of the regulation of expression and structures of two evolutionarily divergent genes for  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase from tomato, *Plant Physiol.* 118 (1998) 661–674.
- [12] X. García-Valenzuela, E. García-Moya, Q. Rascón-Cruz, L. Herrera-Estrella, G.A. Aguado-Santacruz, Chlorophyll accumulation is enhanced by osmotic stress in graminaceous chlorophyll cells, *J. Plant Physiol.* 162 (2005) 650–661.
- [13] M. Gersani, A.E. Graham, P.S. Nobel, Growth response of individual roots of *Opuntia ficus-indica* to salinity, *Plant Cell Environ.* 16 (1993) 827–834.
- [14] I. Ginzberg, H. Stein, Y. Kapulnik, L. Szabados, N. Strizhov, J. Schell, C. Koncz, A. Zilberstein, Isolation and characterization of two different cDNAs of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthase in alfalfa transcriptionally induced upon salt stress, *Plant Mol. Biol.* 38 (1998) 755–764.
- [15] A.A. Gitelson, M.N. Merzlyak, Signature analysis of leaf reflectance spectra: algorithm development for remote sensing of chlorophyll, *J. Plant Physiol.* 148 (1996) 494–500.
- [16] E.W. Hamilton III, S.A. Heckathorn, Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by antioxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine, *Plant Physiol.* 126 (2001) 1266–1274.
- [17] D.J. Hayzer, T. Leisinger, The gene–enzyme relationships of proline biosynthesis in *Escherichia coli*, *J. Gen. Microbiol.* 118 (1980) 287–293.
- [18] D.R. Hoagland, D.I. Arnon, *The Water-culture Method for Growing Plants without Soil* Univ. of California Agric. Exp. Stn. Circ. 347, Univ. of California, Berkeley, CA, 1950.
- [19] C.A.A. Hu, A.J. Delauney, D.P.S. Verma, A bifunctional enzyme ( $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89 (1992) 9354–9358.
- [20] Y. Igarashi, Y. Yoshiba, Y. Sanada, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Wada, K. Shinozaki, Characterization of the gene for  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa*, *Plant Mol. Biol.* 33 (1997) 857–865.
- [21] J.F. Jiménez-Bremont, A. Becerra-Flora, E. Hernández-Lucero, M. Rodríguez-Kessler, J.A. Acosta Gallegos, J.G. Ramírez-Pimentel, Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine, *Biol. Plant.* 50 (2006) 763–766.
- [22] P.B. Kavi Kishor, S. Sangam, R.N. Amrutha, P. Sri Laxmi, K.R. Naidu, K.R.S.S. Rao, S. Rao, K.J. Reddy, P. Theriappan, N. Sreenivasulu, Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: its implications in plant growth and abiotic stress tolerance, *Curr. Sci.* 88 (2005) 424–438.
- [23] S. Kumar, K. Tamura, M. Nei, MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment, *Brief. Bioinform.* 5 (2004) 150–163.
- [24] H.N. Le Houréou, The role of cacti (*Opuntia* spp.) in erosion control, land reclamation, rehabilitation and agricultural development in the Mediterranean Basin, *J. Arid Environ.* 33 (1996) 135–159.
- [25] H.K. Lichtenthaler, C. Buschmann, U. Rinderle, G. Schmuck, Application of chlorophyll fluorescence in ecophysiology, *Radiat. Environ. Biophys.* 25 (1986) 297–308.
- [26] M.E. Loik, P.S. Nobel, Exogenous abscisic acid mimics cold acclimation for cacti differing in freezing tolerance, *Plant Physiol.* 103 (1993) 871–876.
- [27] C. Magne, F. Larher, High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline, *Anal. Biochem.* 200 (1992) 115–118.
- [28] B. Murillo-Amador, A. Cortés-Avila, E. Troyo-Diéguéz, A. Nieto-Garibay, H.G. Jones, Effects of NaCl salinity on growth and production of young cladodes of *Opuntia ficus-indica*, *J. Agron. Crop Sci.* 187 (2001) 269–279.
- [29] A. Nerd, A. Karadi, Y. Mizrachi, Salt tolerance of prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica*), *Plant Soil* 13 (1991) 201–207.
- [30] P.S. Nobel, *Remarkable Agaves and Cacti*, Oxford University Press, New York, 1994.
- [31] P.S. Nobel, N. Wang, R.A. Balsamo, M.E. Loik, M.A. Hawke, Low-temperature tolerance and acclimation of *Opuntia* spp. after injecting glucose or methylglucose, *Int. J. Plant Sci.* 156 (1995) 496–504.
- [32] E. Pimental-Barrios, Prickly pear (*Opuntia* spp.): a valuable fruit for the semi-arid land of Mexico, *J. Arid Environ.* 28 (1994) 1–11.
- [33] D. Rhodes, A.D. Hanson, Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44 (1993) 357–384.
- [34] H.G. Rodríguez, J.K.M. Roberts, W.R. Jordan, M.C. Drew, Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress, *Plant Physiol.* 113 (1997) 881–893.
- [35] M. Rodríguez-Kessler, A.G. Alpuche-Solís, O.A. Ruiz, J.F. Jiménez-Bremont, Effect of salt stress on the regulation of maize (*Zea mays* L.) genes involved in polyamine biosynthesis, *Plant Growth Regul.* 48 (2006) 175–185.
- [36] H.L. Romero-Schmidt, F. Vega-Villasante, H. Nolasco, C. Montaña, The effect of darkness, freezing, acidity and salinity on seed germination of *Ferocactus peninsulæ* (Cactaceae), *J. Arid Environ.* 23 (1992) 389–395.
- [37] N.P. Rout, B.P. Shaw, Salinity tolerance in aquatic macrophytes: probable role of proline, the enzymes involved in its synthesis and C<sub>4</sub> type of metabolism, *Plant Sci.* 136 (1998) 121–130.
- [38] A. Savoure, S. Jaoua, X. Hua, W. Ardiles, M.V. Montagu, N. Verbruggen, Isolation, characterization, and chromosomal location of a gene encoding the  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase in *Arabidopsis thaliana*, *FEBS Lett.* 372 (1995) 13–19.
- [39] W.A. Sawahel, A.H. Hassan, Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline, *Biotechnol. Lett.* 24 (2002) 721–725.
- [40] K. Schwab, U. Heber, Thylakoid membrane stability in drought tolerant and drought-sensitive plants, *Planta* 161 (1984) 37–45.
- [41] M. Seki, J. Ishida, M. Narusaka, M. Fujita, T. Nanjo, T. Umezawa, A. Kamiya, M. Nakajima, A. Enju, T. Sakurai, M. Satou, K. Akiyama, K. Yamaguchi-Shinozaki, P. Caminci, J. Kawai, Y. Hayashizaki, K. Shinozaki, Monitoring the expression pattern of around 7,000 *Arabidopsis* genes under ABA treatments using a full-length cDNA microarray, *Funct. Integr. Genomics* 2 (2002) 282–291.
- [42] F.P. Silverman, D.R. Young, P.S. Nobel, Effects of applied NaCl on *Opuntia humifusa*, *Physiol. Plant.* 42 (1988) 343–348.
- [43] P. Sudhir, S.D.S. Murthy, Effects of salt stress on basic processes of photosynthesis, *Photosynthetica* 42 (2004) 481–486.

- [44] S.B. Tripathi, K. Gurumurthi, A.K. Panigrahi, B.P. Shaw, Salinity induced changes in proline and betaine contents and synthesis in two aquatic macrophytes differing in salt tolerance, *Biol. Plant.* 51 (2007) 110–115.
- [45] Y. Wang, N. Nii, Changes in chlorophyll, ribulose bisphosphate carboxylase-oxygenase, glycine betaine content, photosynthesis and transpiration in *Amaranthus tricolor* leaves during salt stress, *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 75 (2000) 623–627.
- [46] Y. Yoshida, T. Kiyosue, T. Katagiri, H. Ueda, T. Mizoguchi, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Wada, Y. Harada, K. Shinozaki, Correlation between the induction of a gene for  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress, *Plant J.* 7 (1995) 751–760.
- [47] C.S. Zhang, Q. Lu, D.P.S. Verma, Removal of feedback inhibition of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase, a bifunctional enzyme catalyzing the first two steps of proline biosynthesis in plants, *J. Biol. Chem.* 270 (1995) 20491–20496.
- [48] W. Zhi-Qiang, Y. Yong-Ze, O. Ji-Quan, L. Qing-Hua, Z. Chu-Fu, 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 (2007) 695–701.

### **5.3 Análisis de la pérdida de función de genes ortólogos de *Arabidopsis thaliana* aislados en la genoteca sustractiva de nopal en condiciones de estrés por sequía y calor.**

Mediante la construcción de una genoteca sustractiva en nopal logramos el aislamiento y secuenciación de un grupo de genes que se inducen en condiciones de sequía inducida por falta de agua y alta temperatura. Para estudiar la posible función de aquellos genes de función desconocida y aquellos cuya participación en la respuesta de las plantas al estrés abiótico no ha sido caracterizada se utilizaron mutantes por inserción de *Arabidopsis thaliana*.

Para identificar líneas homocigotas de *Arabidopsis thaliana* se diseñaron oligonucleótidos específicos en los uni-genes de interés y en el borde del T-DNA. De esta manera logramos identificar la inserción del T-DNA y la homocigosis de los genes At1g16180 y At3g12830 en las líneas salk\_084244 y cs857312 respectivamente. El gen At1g16180 pertenece a una familia de proteínas de membrana expresadas diferencialmente en tumores y el gen At3g12830 codifica a una proteína similar a proteínas de la familia de respuesta a auxinas y contiene un dominio SAUR de respuesta a auxinas. Análisis de RT-PCR confirmaron la ausencia del gen At1g16180 (gen expresado diferencialmente en tumores) en la línea salk\_084244. Por otro lado este mismo tipo de análisis mostró que el gen At3g12830 (gen similar a proteínas de la familia de respuesta a auxinas) se sobre-expresa en la línea cs857312.

Finalmente realizamos la caracterización fenotípica de la línea “knockout” salk\_084244 la cual pertenece al gen At1g1618 y de la línea sobre-expresora

cs857312 la cual pertenece al gen At3g12830. Para observar si la ausencia o sobre-expresión de los genes At1g16180 y At3g12830 en las líneas salk\_084244 y cs857312 respectivamente, presentan un fenotipo particular, plantas de *A. thaliana* de estas dos líneas fueron sometidas a estrés salino, estrés osmótico, frío y deshidratación. Los resultados muestran que ninguna de estas líneas evaluadas presentó diferencias con respecto a las plantas de *A. thaliana* control. La presencia de un gen homólogo (At3g06170) al gen At1g16180 en el genoma de *Arabidopsis*, sugiere que la función de éste último es reemplazada, por lo que será necesario realizar una doble mutante para determinar finalmente si este gen esta involucrado en la respuesta a estrés abiótico.

## 1. Introducción

Una herramienta esencial para el análisis funcional de los genomas es la creación de mutaciones de pérdida de la función de los genes. De manera particular las mutantes son una herramienta primordial para el entendimiento de los mecanismos moleculares y celulares de tolerancia al estrés abiótico (Vartanian, 1996). Alonso y col. (2003), generaron una gran colección de mutantes de *A. thaliana* mediante eventos de inserción al azar de T-DNA transferidos por *Agrobacterium* y posteriormente cada una de las inserciones en el genoma fueron tipificadas.

Para caracterizar el fenotipo de pérdida de función de los genes ortólogos de once uni-genes aislados e identificados en la SSH de nopal, solicitamos al ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center; Ohio State University, Columbus, OH) las mutantes por inserción de T-DNA de *A. thaliana* correspondientes a dichos genes. Los uni-genes de la SSH fueron seleccionados tomando en cuenta los siguientes criterios: genes de función desconocida y genes cuya participación en situaciones de estrés ha sido poco descrita.

A continuación se describe de manera general la información de cada gen de *A. thaliana* seleccionado:

1.- At5g41700 (ubiquitin conjugatin enzyme 8; UBC8) codifica a uno de los polipéptidos que constituye la enzima de conjugación de ubiquitina (E2). El sistema de ubiquitinación es un mecanismo utilizado por los eucariontes para modificar oportuna y acertadamente al proteoma durante procesos de crecimiento,



desarrollo y en respuesta a agobios tanto abióticos como bióticos (Hirota y col., 2008). La ubiquitinación es mediada principalmente por tres enzimas: enzima de activación de ubiquitina (E1), enzima de conjugación de ubiquitina (E2) y ligasas de ubiquitina (E3) (Hirota y col., 2008).

2.- At1g55740 (seed imbibition 1; SIP1). Las proteínas rafinosa sintetasa son también conocidas como proteínas sip1 (seed imbibition proteins). La rafinosa sintetasa (RS; EC 2.4.1.82) cataliza la síntesis de rafinosa a partir de sacarosa y galactinol. La rafinosa es un oligosacárido encontrado en semillas y otros tejidos de plantas y funciona como un soluto compatible en respuesta a estrés abiótico en plantas (Taji y col., 2002). En la base de datos del genoma de *A. thaliana* han sido identificados 6 genes que codifican para rafinosas sintetetas putativas. La expresión del gen rafinosa sintetasa 1 (RS1; At1g55740) no mostró cambios en plantas tratadas con metilviológeno, un inductor de daño oxidativo, a diferencia de los genes RS2, -4, -5 y -6 cuya transcripción fue inducida a las 3 y 6 horas después del tratamiento con metilviológeno (Nishizawa y col., 2008). En los microarreglos del BAR (Bio-Array Resource for Arabidopsis Functional Genomics; [www.bar.utoronto.ca/](http://www.bar.utoronto.ca/)) este gen es inducido por calor y por estrés osmótico a las 12 y 24 horas.

3.- At5g49230 (hypersensitive to red and blue; HRB1) codifica a una proteína localizada en el núcleo. Esta proteína pertenece a la familia de proteínas Di19 (drought induced 19) y contiene un dominio “ZZ zinc finger”, el cual está implicado en interacciones proteína-proteína en otros organismos (Kang y col., 2005). Además se ha descrito que la interrupción de este gen en Arabidopsis mediante

una inserción de T-DNA es responsable de la hipersensibilidad a luz roja y azul, y de un hipocotilo corto (Kang y col., 2005).

4.- At1g49975. Es una proteína de función desconocida. Un análisis en la base de datos expasy (<http://ca.expasy.org/>) mostró que esta proteína tiene varios dominios; por ejemplo un sitio de fosforilación proteín cinasa dependiente de cAMP- y cGMP.

5.- At2g46100 contiene un dominio NTF2 y su expresión es regulada en la mutante dpa1 (deficiency of plastid ATP synthase1) de Arabidopsis (Dal y col., 2004).

6.- At3g12830 codifica a una proteína similar a proteínas de la familia de respuesta a auxinas y contiene un dominio SAUR de respuesta a auxinas. Su expresión disminuye en la mutante At5pt13-1, la cual muestra un defecto en el desarrollo de la vena del cotiledón, que es completamente corregido mediante la aplicación de auxinas exógenas y parcialmente mediante un brasinoesteroide (brasinolida) (Lin y col., 2005).

7.- At1g03330 codifica a una proteína que presenta un dominio “like-sm ribonucleoprotein”. Este motivo es encontrado en las proteínas lsm (like-sm), y adopta una estructura “core” que consiste de un barril beta abierto. Las proteínas lsm son importantes moduladores de la biogénesis y función del ARN y participan en el proceso de splicing en los pre-mARN (He y Parker, 2000; Kufel y col., 2003).

8.- At5g56550 es similar al gen de función desconocida At4g26288 de *A. thaliana* ([www.arabidopsis.org/](http://www.arabidopsis.org/)). Este gen tiene en común tres motivos con el gen MTD1 de *Medicago truncatula*. Los motivos son: sitio de fosforilación caseína cinasa II, sitio de fosforilación proteín cinasa C y sitio de N-glicosilación. En nódulos de *M.*

*truncatula* los cADNs que corresponden a los genes MTD1 y MTD2 se sobreexpresan (Curioni y col., 2000).

9.- At1g16180 pertenece a una familia de proteínas de membrana expresadas diferencialmente en tumores (TDE, tumour differentially expressed family protein) de ratones y humano. Estas proteínas contienen dominios transmembranales (TMS membrane family protein) ([www.arabidopsis.org/](http://www.arabidopsis.org/)). Su función es aún desconocida, aunque ha sido reportado que incorporan serina a las membranas y facilitan la síntesis de dos derivados de lípidos como la fosfatidilserina y los esfingolípidos (Inuzuka y col., 2005).

10.- At4g01150 es similar a una treonina endopeptidasa de *A. thaliana* (At4g38100) y su expresión es regulada en la mutante *dpa1* (deficiency of plastid ATP synthase1) de Arabidopsis (Dal y col., 2004).

11.- At1g70505 es similar a un gen que codifica a una proteína de función desconocida de *A. thaliana* (At1g10660) ([www.arabidopsis.org/](http://www.arabidopsis.org/)).

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Material vegetal

Las semillas de *A. thaliana* fueron solicitadas al ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center; Ohio State University, Columbus, OH; <http://www.biosci.ohio-state.edu/pcmb/Facilities/abrc/index.html>). Las semillas fueron desinfectadas con una solución para esterilizar (Tabla 6) durante 10 min y enjuagadas con agua destilada estéril 5 veces para eliminar los residuos de la solución. Una vez esterilizadas las semillas fueron colocadas para su germinación en medio MS (Tabla 7) con el antibiótico adecuado.

**Tabla 6.** Solución para esterilizar semillas de *A. thaliana*

Contenido	Volúmen
Solución de cloro al 35 %	60 ml
Tritón	400 µl
H <sub>2</sub> O	hasta 200 ml

### 2.2 Medio de cultivo MS

Para el cultivo de plantas de *A. thaliana in vitro* se empleó el medio de Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962). El medio de cultivo se preparó de acuerdo a las indicaciones de la Tabla 7.

**Tabla 7.** Medio de Murashige y Skoog para *A. thaliana*

Contenido	Para 1 L de Medio MS 1X
H <sub>2</sub> O destilada	800 ml
Preparado MS	4.7 g
Sacarosa	10 g
2-(N-morpholino) ácido etanosulfónico (MES)	0.5 g
Ajustar pH a 5.7 con KOH 1 M	
Agar	8 g

### 2.3 Extracción de ADN genómico

Aproximadamente 7 mg de plántulas de *A. thaliana* se congelaron en nitrógeno líquido en un tubo Eppendorf. Estas muestras se pulverizaron con un bastoncillo, se añadieron 300 µl del buffer de homogenización (Tabla 8) y 150 µl de acetato de sodio 3 M pH 5.2, y la mezcla se agitó para permitir su homogenización. Los tubos se colocaron a -20° C durante 10 min y se centrifugaron a 13,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf y se añadió el mismo volumen de isopropanol. Se mantuvieron a temperatura ambiente durante 5 min. Posteriormente se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 min y se desechó el sobrenadante. El ADN se lavó con etanol al 70%, se centrifugó 5 min a 7,000 rpm, se descartó el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente. El ADN se resuspendió en agua con RNasa.

**Tabla 8.** Buffer de homogenización

Contenido
0.2 M Tris-HCl pH 8.5
0.25 M NaCl
0.025 M EDTA
0.5 % SDS

### 2.4 Confirmación de la inserción del T-DNA

Mediante análisis de PCR se confirmó la presencia del T-DNA en cada una de las líneas de *A. thaliana*. Las amplificaciones de PCR fueron realizadas en un volumen de reacción de 50 µl. La mezcla de reacción contenía 1 µl de ADN genómico; Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTPs 125 µM, 0.2 µM de cada oligonucleótido y 1 µl de Taq polimerasa. Las muestras fueron

analizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%. Los pares de oligonucleótidos diseñados para amplificar cada fragmento mediante PCR se muestran en la Tabla 9.

**Tabla 9.** Oligonucleótidos diseñados para determinar homocigosis

Gen	Línea de <i>A. thaliana</i>	Oligonucleótidos diseñados	
At5g41700	salk_130332	sentido	5'- CAGCCGTTTCATATCTCTACACTTGGCTAT-3'
		antisentido	5'-AGGGAAGTGAATGGTAACGAGAAACACAC-3'
At1g55740	salk_090247	sentido	5'- GTGATTGCTTCTTCAGTGATCCAGTCAG-3'
		antisentido	5'-GCACGGATCTACTAGTCTACTACTATCTAC-3'
	cs851185	sentido	5'-GGCGTTCCGGAGAATGTCTTAGTT-3'
		antisentido	5'-GTCCAAGACTCAATGAAGGGTCATC-3'
		sentido	5'-GCATTGTAGTGAGGTTATATTTATACATGGTG-3'
		antisentido	5'-CCAATCTGTTTGATTTGATTGGTCTGG-3'
At5g49230	salk_087868	sentido	5'-TGGGAGATGTTGAAGGAGAAGACGATTTG-3'
		antisentido	5'-GCACAAACTTGCTCTTCTTTGCCTTCTCTTGA-3'
	salk_113695	sentido	5'-GTCAAAAGACCTTGGGACTCAACACGTC-3'
		antisentido	5'-CCCACCTTCTTTGTGCAGACAGGAC-3'
At2g46100	salk_008457	sentido	5'-GATGGTGGTCGTTCAATCTTCCGGACT-3'
		antisentido	5'-CTCTGTTGCTTGTCCAACCGAGAAG-3'
At3g12830	salk_107291	sentido	5'-GGCCTCTTGTAATTATAATCAGTTTACCATG-3'
		antisentido	5'-AGTCCCGTCACCGATTAGATCCTG-3'
	cs857312	sentido	5'-AGTGGAATTGGATATCCAGTCTTAGTTG-3'
		antisentido	5'-CGTCACCGATTAGATCCTGAACAT-3'
At5g56550	cs824310	sentido	5'-TAGTGGTGACGAGGACATGATACG-3'
		antisentido	5'-CTTTTAAACCCTCTCTTCATAAGATCTTCAAGG-3'
At1g16180	salk_084244	sentido	5'-GTCCGAAATCAGGAGCGAGATAATAAAG-3'
		antisentido	5'-GAGAAGAGTAGTGAAGAACCAGCA-3'
At1g70505	cs852555	sentido	5'-GGTGAAGAATGTGTTTAGCAGAATTGATTTGTC-3'
		antisentido	5'-GAAGATAGCATTGACCGAGTGCATAATCA-3'

## 2.5 Extracción de ARN

Plántulas de *A. thaliana* fueron congeladas en nitrógeno líquido y homogenizadas en un mortero. Se añadieron 500 µl de solución Z6 (Tabla 10) y 500 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamilico (25:24:1). Esta mezcla se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf, se añadieron 500 µl de cloroformo: alcohol isoamilico (24:1) y se centrifugó durante 5 min a 12,000 rpm. Se transfirieron 400 µl del sobrenadante a un tubo Eppendorf y se añadieron 40 µl de acetato de sodio 3 M y 300 µl de isopropanol para precipitar el ARN. Los tubos Eppendorf se mantuvieron durante 10 min en hielo y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se descartó, se añadió 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó 5 min a 12,000 rpm. Finalmente el ARN se resuspendió en 35 µl de agua-DEPC. La calidad del ARN fue observada en un gel en condiciones desnaturalizantes y se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 y 280 nm.

**Tabla 10.** Solución Z6

Contenido	Para 100 ml
H <sub>2</sub> O	37.5 ml
Hidrocloreuro de guanidina	76.4 g
MES	0.39 g
Ajustar pH a 7.0 con NaOH 4-10 M	
Ajustar a 100 ml	

## 2.6 Síntesis de ADN complementario (cADN)

El ARN total obtenido de las líneas cs857312 y salk\_084244 de *A. thaliana* fue digerido con la enzima DNAsa I (Roche, Germany) durante 20 min a 30° C eliminando así el ADN genómico presente. Para inactivar la enzima se añadió EDTA 0.2 M y se incubó la reacción a 75° C durante 10 min. La síntesis de la

primera cadena de cADN fue realizada en un volumen total de 20  $\mu$ l mediante el sistema: M-MLV Reverse transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA). Cada mezcla de reacción contenía 1  $\mu$ g de ARN total digerido con DNAsa I, 0.3 mM de la mezcla de dNTP, 0.5  $\mu$ g de oligo (dT)<sub>12-18</sub>. La mezcla de reacción fue incubada a 65° C durante 5 min y después se mantuvo en hielo durante 1 min. Después se añadieron los siguientes reactivos Tris-HCl 25 mM (pH 8.4), KCl 37.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, ditioneitol (DTT) 0.01 mM, 40 U de inhibidor de ribonucleasa recombinante (RNaseOUT™) y 200 U de M-MLV RT. Las mezclas de reacción fueron incubadas a 37° C por 52 min y finalmente a 70° C por 15 min. Simultáneamente se realizó una reacción control para cada muestra sin transcriptasa reversa para verificar la ausencia de ADN genómico.

## 2.7 Reacción en cadena de la polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems). Las amplificaciones de PCR fueron realizadas en un volumen de reacción de 50  $\mu$ l. La mezcla de reacción contenía 1 o 2  $\mu$ l según fuera el caso de cADN como molde obtenido por transcripción reversa a partir de RNA aislado de las líneas cs857312 y salk\_084244 de *A. thaliana*; Tris-HCl (pH 8.4) 20 mM, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 2.5 mM, dNTPs 125  $\mu$ M, 0.2  $\mu$ M de cada oligonucleótido y 2.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, USA). Las condiciones de amplificación de la PCR para el gen At3g12830 (línea cs857312) fueron: 5 min a 94° C seguido de 40 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 61° C y 60 s a 72° C, seguido de una extensión final a 72° C durante 7 min. Las condiciones de amplificación de la PCR para el gen At1g16180 (línea



salk\_084244) fueron: 5 min a 94° C seguido de 40 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 64° C y 90 s a 72° C, seguido de una extensión final a 72° C durante 7 min. Finalmente las condiciones de amplificación para el gen APT (adenosine phosphotransferase) de *A. thaliana* (control de carga) (Gómez-Mena y col., 2005) fueron: 5 min a 94° C seguido de 30 ciclos de 30 s a 94° C, 30 s a 55° C y 60 s a 72° C, seguido de una extensión final a 72° C durante 7 min. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%.

### 3. Resultados y Discusión

En la Tabla 11 se muestran los uni-genes seleccionados en la SSH de plantas de nopal crecidas bajo condiciones de estrés abiótico, para ser estudiados en líneas mutantes insercionales de *Arabidopsis thaliana*. Para cada gen se solicitaron al ABRC una o dos líneas insercionales de T-DNA (<http://www.biosci.ohio-state.edu/pcmb/Facilities/abrc/abrchome.htm>).

**Tabla 11.** Genes para ser analizados en *Arabidopsis thaliana*

Gen	No. TIGR	Línea Salk	Línea Wisconsin	Línea Syngenta
Ubiquitin-conjugation enzyme	At5g41700	SALK_130332		
Alkaline alpha-galactosidase seed imbibition protein	At1g55740	SALK_090247	Cs851185	
Hrb1 (hypersensitive to red and blue)	At5g49230	SALK_087868 SALK_113695		
unknown protein	At1g49975	SALK_021405		
unknown protein	At2g46100	SALK_008457		
unknown protein	At3g12830	SALK_107291	Cs857312	
unknown protein	At1g03330	SALK_146797		
unknown protein	At5g56550			Cs824310
unknown protein	At1g16180	SALK_084244		
unknown protein	At4g01150	SALK_030000		
unknown protein	At1g70505		Cs852555	

Las semillas fueron germinadas en medio MS con kanamicina para el caso de las líneas Salk y con el herbicida basta para el caso de las líneas Wisconsin y Syngenta. Cinco de las once líneas (At5g41700:salk\_130332; At1g55740:salk\_090247; At1g49975:salk\_021405; At2g46100:salk\_008457; At1g70505:cs852555) no germinaron. Se ha observado que algunas líneas pierden la resistencia a kanamicina probablemente porque se reprime el gen *ntpII* (comunicación personal con Julio Salinas).

Con relación al gen At1g55740 (Alkaline alpha-galactosidase seed imbibition protein), la línea insercional salk\_090247 no germinó, sin embargo, una línea Wisconsin de dicho gen si logró ser caracterizada (cs851185). Los oligonucleótidos diseñados para analizar la presencia del T-DNA en la línea cs851185 amplificaron dos bandas, por esta razón se diseñó otro par de oligonucleótidos en las regiones UTR para lograr amplificar la banda de interés, sin embargo nuevamente se amplificaron dos bandas. En el genoma de *A. thaliana* han sido identificadas 5 copias de este gen por lo que quizá los oligonucleótidos amplifican el gen At1g55740 y otro de sus parálogos.

Para la línea salk\_087868 del gen At5g49230 (hypersensitive to red and blue; HRB1) se genotipificaron las únicas 4 plántulas que germinaron. Las dos primeras genotipificadas fueron heterocigotas y las restantes no presentaron inserción del T-DNA. Para la línea salk\_113695 del mismo gen se genotipificaron las 5 plántulas que germinaron, siendo todas heterocigotas. Se esperó a obtener la segunda generación para obtener líneas homocigotas de éstas dos líneas del gen At5g49230.

Para el gen At3g12830 (auxin-responsive family protein) se analizaron dos líneas, una línea salk\_107291 y una línea Wisconsin cs857312. Para la línea salk\_107291 (ubicación tentativa del T-DNA a 300 UTR5) ninguna de las plantas analizadas tuvo la inserción del T-DNA. Mediante análisis de PCR con oligonucleótidos diseñados en el borde del T-DNA y en el gen At3g12830 se confirmó la homocigocidad de la línea Wisconsin cs857312. Para verificar que la inserción del T-DNA interrumpe el gen At3g12830 se realizó un análisis de RT-PCR. Como se puede observar en la Figura 6, el gen At3g12830 se sobre-expresa en

comparación con la planta silvestre (Col-0). Este resultado muestra que la línea cs857312 es una línea sobre-expresora. Esto quizá se debe a que el T-DNA está insertado en la región promotora del gen At3g12830 (auxin-responsive family protein) a -504 del ATG y a -408 del sitio de inicio de la transcripción (+1) (Fig 7) y la inserción puede estar afectando a una zona represora del promotor, aunque el análisis de los motivos localizados en esta parte del promotor en la base de datos place (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) parece indicar que no existe sitio aparente de unión de represores (Fig. 7). Por otro lado, este análisis también mostró que en la región promotora del gen At3g12830 (auxin-responsive family protein) están presentes diversos motivos que a continuación se describen (Fig. 7): GAAAAA "GT-1 motif" es un motivo GT-1. Este motivo juega un papel en la inducción por sal y patógenos del gen S<sub>CaM</sub>-4 que codifica para la isoforma 4 de la calmodulina (Park y col., 2004). En la región promotora del gen que estudiamos (At3g12830: auxin-responsive family protein) el motivo GT-1 está localizado tanto en la cadena 5'-3' como en la 3'-5'. CCAAT "ccaat box" es una caja encontrada en el promotor de genes que responden a estrés por calor como la chaperona de *A. thaliana* Hsp90-1 (Haralampidis y col., 2002). CAAATG "MYC" este sitio de reconocimiento es encontrado en el promotor del gen de respuesta a deshidratación *rd22*, además es el sitio de unión de ICE1 (inducer of CBF expression 1) un factor de transcripción que regula la transcripción de los factores de transcripción CBF/DREB1 (C-repeat (CRT)-binding factor/dehydration-responsive element binding protein 1) en frío en *A. thaliana* (Chinnusamy y col., 2003). La presencia de los motivos de respuesta a estrés mencionados anteriormente en la región promotora del gen At3g12830 sugiere que este gen

participa en el estrés biótico y abiótico. TGAC es el sitio de unión de WRKY71 de arroz, un represor transcripcional de la vía de señalización de giberelinas (Zhang y col., 2004). TGACA “W box” esta caja es encontrada en la región promotora del represor transcripcional ERF3 en tabaco y se ha sugerido que está involucrada en la activación de este gen por herida (Nishiuchi y col., 2004). El sitio ACTTTA es requerido para la inducción por auxinas del gen rolB (Baumann y col., 1999). TGTCTC es el sitio de unión del factor ARF (auxin response factor), este sitio de unión ha sido localizado en la región promotora de genes de respuesta a auxina como los genes SAURs (small auxin-up RNAs) (Ulmasov y col., 1999). En el gen At3g12830 este sitio está localizado a –25 bases de la inserción del T-DNA por lo que al tratar plantas de esta línea sobre-expresora con auxinas, el elemento TGTCTC quizá no sería funcional y no observaríamos una respuesta del transcrito a auxinas. Por otro lado en la región 3’ UTR del gen At3g12830 (auxin-responsive family protein) se localiza un elemento DST (downstream element) (Fig. 7). La familia de genes SAURs son genes de respuesta a auxina inducidos específicamente a los pocos minutos de la aplicación de auxinas y codifican mRNAs altamente inestables (McClure y Guilfoyle, 1989; Franco y col., 1990). La inestabilidad de los mRNAs SAURs ha sido atribuido a la presencia del elemento DST altamente conservado en la región 3’ UTR (Gil y Green, 1996). La presencia de un probable elemento DST en el gen que estudiamos sugiere que el mRNA de este gen es inestable. En los datos de microarreglos de *A. thaliana* (Arabidopsis eFP browser; <http://www.bar.utoronto.ca/>) se observa que el gen At3g12830 es inducido por la aplicación de ciclohexamida, un bloqueador de la traducción, por lo

que quizá la ausencia del proceso de traducción involucra la falta de alguna proteína represora y como consecuencia la desrepresión del gen At3g12830.

Las plantas de la línea cs857312 sobre-expresora del gen *SAUR* de *A. thaliana* (At3g12830) se sometieron a los siguientes tratamientos de estrés para analizar el fenotipo: estrés salino (80 mM, 100 mM, 130 mM y 150 mM de NaCl), estrés osmótico (100 mM, 200 mM y 300 mM de manitol), estrés por frío (4° C) y deshidratación. Sin embargo en ninguno de los tratamientos anteriores se observó un fenotipo particular (datos no mostrados). Lamentablemente la línea salk\_107291 (ubicación tentativa del T-DNA a 300 UTR5) no tuvo la inserción del T-DNA y tampoco hay una línea insercional dentro del ORF de dicho gen, por lo que una propuesta para silenciar el gen sería la técnica de RNA de interferencia. Por otro lado, en los datos de microarreglos de *A. thaliana* (Arabidopsis eFP browser; <http://www.bar.utoronto.ca/>) (Fig. 8A) y en la página AtGenExpress (<http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp>) se observa que este gen responde a estrés biótico. La mayor inducción se observa a las 24 h cuando *A. thaliana* es infectada con *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 y a las 4 h con los elicitores Hrpz y GST-NPP1 (Fig. 8B). Además como ya había sido mencionado anteriormente este gen presenta en su región promotora un motivo GT-1 de respuesta a estrés biótico. Dados estos antecedentes sería importante evaluar si la sobre-expresión de éste gen participa en la respuesta a estrés biótico.

La línea salk\_146797 del gen At1g03330 no se caracterizó debido a que está siendo analizada por el grupo del Dr. Salinas.

La línea cs824310 del gen At5g56550 fue heterocigota. Se esperó a obtener la segunda generación para ser analizada y obtener una línea homocigota para este gen.

Mediante análisis de PCR con oligonucleótidos diseñados en el borde del T-DNA y en el gen At1g16180 (tumour differentially expressed (TDE) family protein/TMS membrane family protein) demostramos que la línea salk\_084244 es homocigota. Para verificar que la inserción del T-DNA interrumpe el gen At1g16180 se realizó un análisis de RT-PCR y se observó que esta es una línea knockout para el gen de interés (Fig. 9). Las plantas knockout salk\_084244 se sometieron a los siguientes tratamientos para observar un posible fenotipo: estrés salino (80 mM, 100 mM, 130 mM y 150 mM de NaCl), estrés osmótico (100 mM, 200 mM y 300 mM de manitol), estrés por frío (4° C) y deshidratación. Los resultados indican que en ninguno de los tratamientos anteriores se observó fenotipo (datos no mostrados). El gen At1g16180 pertenece a una familia de proteínas de membrana expresadas diferencialmente en tumores. Estas proteínas contienen dominios transmembranales (tumour differentially expressed (TDE) family protein/TMS membrane family protein) y su función es aún desconocida. En el 2005 Inuzuka y col., reportaron que estas proteínas incorporan serina a las membranas y facilitan la síntesis de dos derivados de lípidos la fosfatidilserina y los esfingolípidos. Los genes que codifican para estas proteínas de membrana han sido identificados en varios organismos desde levadura hasta humano (Grossman y col., 2000). La marcada identidad en los residuos de aminoácidos de estas proteínas sugiere una función fisiológica importante para éstas. Sin embargo, en *Saccharomyces cerevisiae* el gen TMS1 que codifica para un miembro de esta familia de proteínas

fue interrumpido y la mutante no mostró un fenotipo significativo bajo diferentes condiciones de estrés (Grossman y col., 2000). El gen At1g16180 de *Arabidopsis* tiene un gen homólogo At3g06170. En la línea knockout salk\_084244 el gen At1g16180 es quizá reemplazado por el gen At3g06170 para realizar su función. La identidad entre estas dos proteínas es del 64.4% (Fig. 10). Para probablemente observar un fenotipo como consecuencia de la interrupción de estos genes y caracterizar su función sería interesante realizar una doble mutante para el gen At1g16180 y su homólogo At3g06170.

Cuando se diseñaron los oligonucleótidos, en la base de datos del TAIR (<http://www.arabidopsis.org>) no estaba descrita la posición de la inserción del T-DNA en el locus At4g01150, por lo que no se diseñaron oligonucleótidos para verificar la inserción del T-DNA en la línea salk\_030000.

Finalmente el uso de líneas insercionales de *A. thaliana* nos dará la oportunidad de conocer la participación de genes cuya función hasta este momento no ha sido descrita en el estrés.



#### 4. Pies de figura

Fig. 7 (A) Representación del locus At3g12830 (auxin-responsive family protein). La inserción del T-DNA en la línea cs857312 está en el promotor. (B) La sobre expresión del gen At3g12830 es detectada en la línea insercional cs857312. El ARN fue extraído de plantas “wild type” (wt; col-0) y de plantas de la línea mutante cs857312. El gen adenosin fosfotransferasa (APT) fue usado como control de carga.

Fig. 8 Análisis del promotor y localización de la inserción del T-DNA en el gen At3g12830 (auxin-responsive family protein) en la línea cs857312. ■ Promotor ■ 5' y 3' UTR ■ ORF ■ T-DNA. Los motivos GAAAAA, CCAAT, CAAATG y ACTTTA localizados en el promotor están indicados con una línea, además los motivos TTTTTC, CAAATG, GTCA y AGTCA que se encuentran en dirección 3' - 5' están marcados con el símbolo (-). El primer nucleótido del mRNA es indicado como +1. El elemento DST en la región 3' UTR se muestra en un recuadro. Tres posibles señales poly(A) están marcadas en negritas.

Fig. 9 Análisis de la expresión del locus At3g12830 en presencia de *Pseudomonas syringae* y elicitores. (A) Esquema de la inducción del locus At3g12830 en hojas de *A. thaliana* infiltradas con *P. syringae* y tratadas con elicitores. (B) Intensidad de la expresión del locus At3g12830 en *A. thaliana* en presencia de *P. syringae* pv tomato DC3000 y en presencia de los elicitores HrpZ y GST-NPP1.

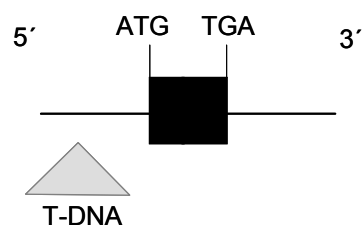
Fig. 10 (A) Representación del locus At1g16180 (tumour differentially expressed (TDE) family protein / TMS membrane family protein). La inserción del T-DNA en la línea salk\_084244 está localizada en el segundo exón. (B) La expresión del gen At1g16180 no es detectada en la mutante salk\_084244. El ARN fue extraído de plantas "wild type" (wt; col-0) y de plantas de la línea mutante salk\_084244. El gen adenosin fosfotransferasa (APT) fue usado como control de carga.

Fig. 11 Alineamiento de aminoácidos derivado de la identidad de los genes At1g16180 y At3g06170 de *A. thaliana*. Los asteriscos indican residuos idénticos y los puntos sustituciones de aminoácidos. Los espacios introducidos optimizan el alineamiento. El alineamiento fue realizado con el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>).

## 5. Figuras

Figura 7

(A)



(B)

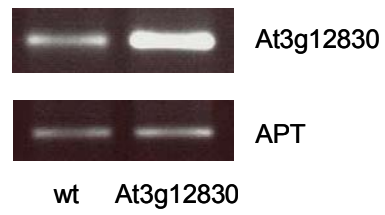


Figura 8

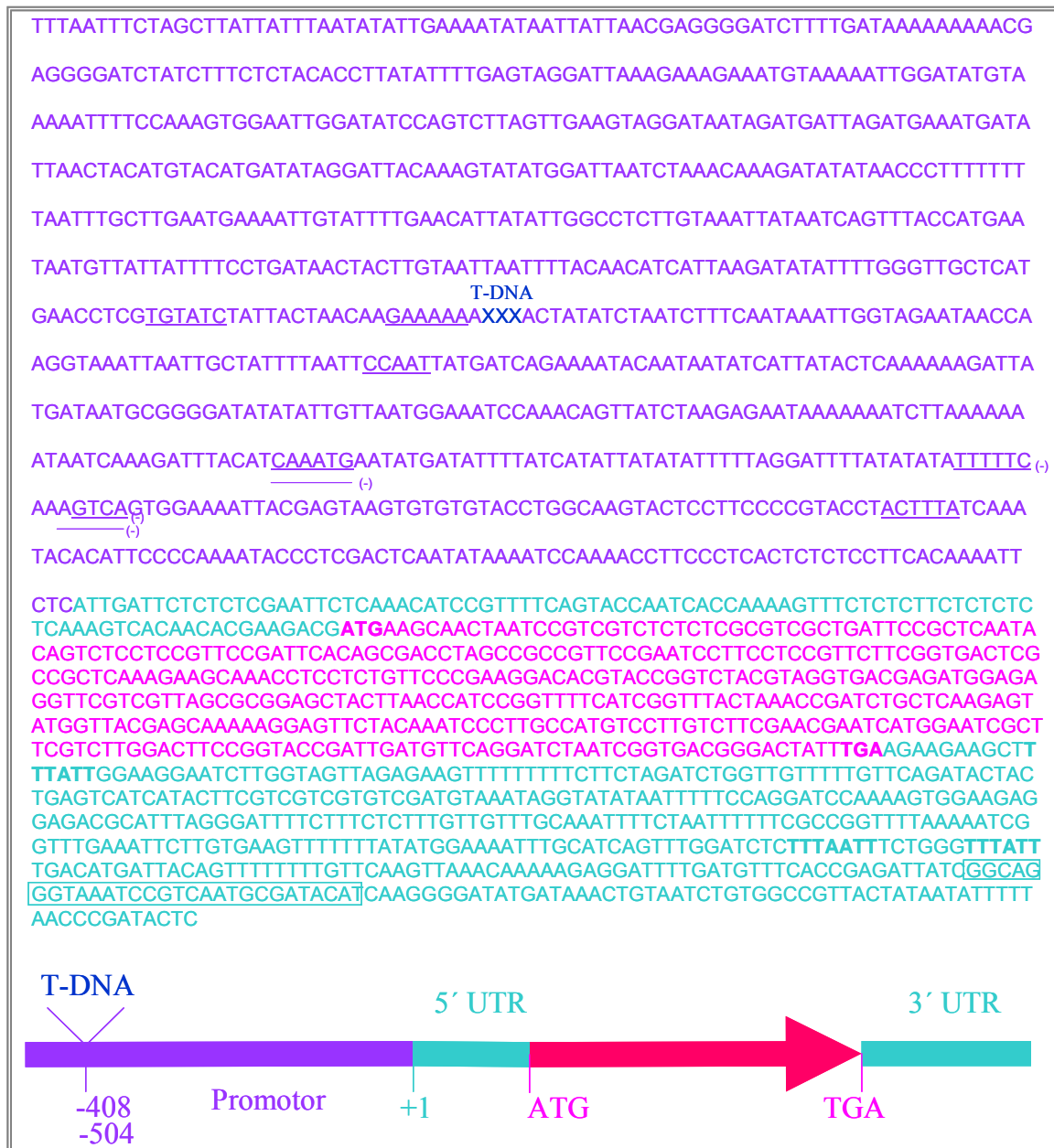
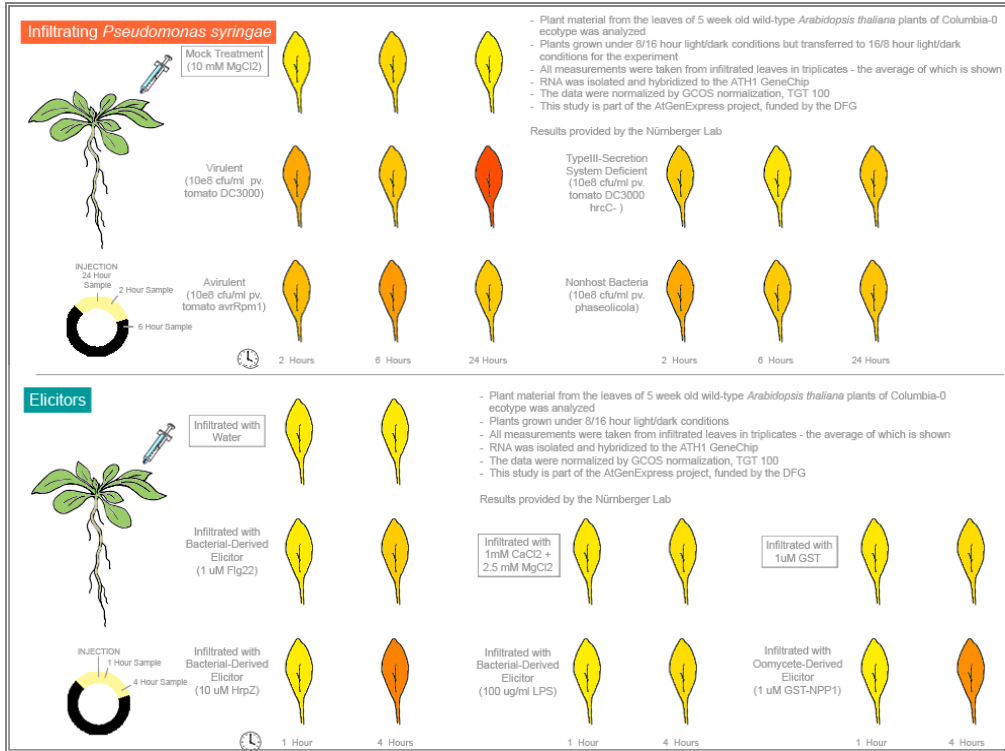


Figura 9

A



B

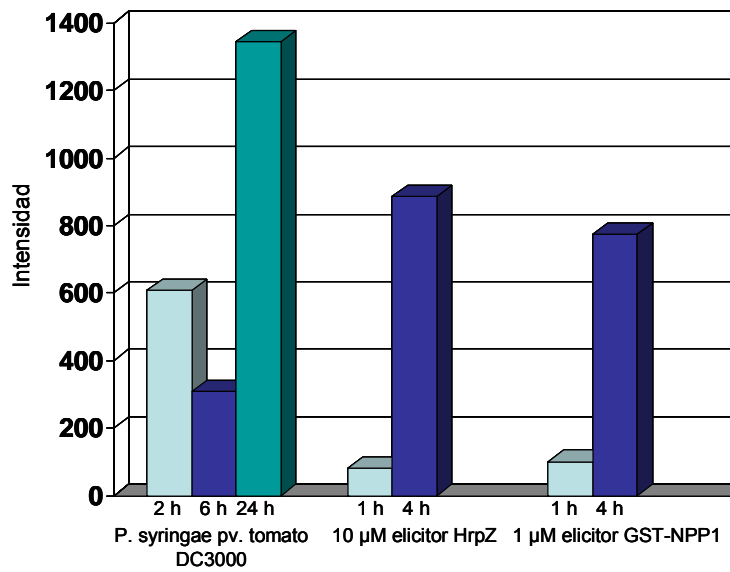
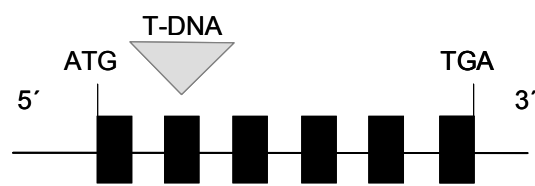
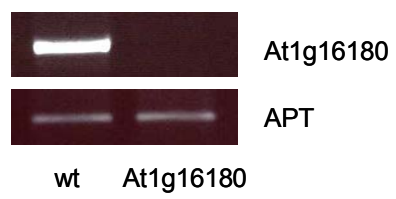


Figura 10

(A)



(B)





## 7. Referencias

- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen H, Shinn P, Stevenson DK, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers CC, 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 DE, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby WL, Berry CC, Ecker JR (2003)** Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657
- Baumann K, De Paolis A, Costantino P, Gualberti G (1999)** The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tissue-specific and auxin regulated expression of the rolB oncogene in plants. *Plant Cell* 11: 323-333
- Bork P (1993)** The modular architecture of a new family of growth regulators related to connective tissue growth factor. *FEBS letters* 327:125-130
- Curioni PMG, Reidy B, Flura T, Vögeli-Lange R, Nösberger J, Hartwig UA (2000)** Increased abundance of MTD1 and MTD2 mRNAs in nodules of decapitated *Medicago truncatula*. *Plant Molecular Biology* 44: 477-485
- Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee BH, Hong X, Agarwal M, Zhu JK (2003)** ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 17: 1043-1054
- Dal CB, Lezhneva L, Biehl A, Leister D, Strotmann H, Wanner G, Meurer J (2004)** Inactivation of the chloroplast ATP synthase  $\gamma$  subunit results in high non



photochemical fluorescence quenching and altered nuclear gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 1060–1069

**Franco AR, Gee MA, Guilfoyle TJ** (1990) Induction and superinduction of auxin-responsive mRNAs with auxin and protein synthesis inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry* 265: 15845–15849

**Gil P, Green PJ** (1996) Multiple regions of the *Arabidopsis* SAUR-AC1 gene control transcript abundance: the 3' untranslated region functions as an mRNA instability determinant. *The Embo Journal* 15: 1678–1686

**Gómez-Mena C, de Folter S, Costa MMR, Angenent GC, Sablowski R** (2005) Transcriptional program controlled by the floral homeotic gene *AGAMOUS* during early organogenesis. *Development* 132: 429-438

**Grossman TR, Luque JM, Nelson N** (2000) Identification of a ubiquitous family of membrane proteins and their expression in mouse brain. *The Journal of experimental Biology* 203: 447-457

**Haralampidis K, Milioni D, Rigas S, Hatzopoulos P** (2002) Combinatorial interaction of cis elements specifies the expression of the *Arabidopsis* AtHsp90-1 gene. *Plant Physiology* 129: 1138-1149.

**He W, Parker R** (2000) Functions of Lsm proteins in mRNA degradation and splicing. *Current Opinion in Cell Biology* 12: 346-350

**Hirota, Motoaki T, Kazuo S, Tatsuya S, Yaeta S, Endo** (2008) High-throughput detection of ubiquitination and poly-ubiquitination based on wheat cell-free protein production system. 19th International Conference on Arabidopsis Research

**Inuzuka M, Hayakawa M, Ingi T** (2005) Serinc, an activity-regulated protein family, incorporates serine into membrane lipid synthesis. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 35776-35783

**Kang X, Chong J, Ni M** (2005) Hypersensitive to red and blue 1, a ZZ-type zinc finger protein, regulates phytochrome B-mediated red and cryptochrome-mediated blue light responses. *The Plant Cell* 17: 822-835

**Kufel J, Allmang C, Petfalski E, Beggs J, Tollervey D** (2003) Lsm proteins are required for normal processing and stability of ribosomal RNAs. *Current Opinion in Cell Biology* 278: 2147-2156

**Lin WH, Wang Y, Mueller-Roeber B, Brearley CA, Xu ZH, Xue HW** (2005) At5PTase13 modulates cotyledon vein development through regulating auxin homeostasis. *Plant Physiology* 139: 1677-1691

**McClure BA, Guilfoyle T** (1989) Rapid redistribution of auxin-regulated RNAs during gravitropism. *Science* 243: 91–93

**Nishiuchi T, Shinshi H, Suzuki K** (2004) Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 gene by wounding in tobacco leaves: Possible involvement of NtWRKYs and autorepression. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 55355-55361

**Nishizawa A, Yabuta Y, Shigeoka S** (2008) Galactinol and raffinose as a novel function to protect plants from oxidative damage. *Plant physiology* 147: 1251–1263

**Park HC, Kim ML, Kang YH, Jeon JM, Yoo JH, Kim MC, Park CY, Jeong JC, Moon BC, Lee JH, Yoon HW, Lee SH, Chung WS, Lim CO, Lee SY, Hong JC, Cho MJ** (2004) Pathogen and NaCl induced expression of the SCaM-4 promoter is

mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiology* 135: 2150-2161.

**Taji T, Ohsumi C, Luchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 29: 417–426.

**Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle TJ** (1999) Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant Journal* 19: 309-319

**Vartanian N** (1996) Mutants as tools to understand cellular and molecular drought tolerance mechanisms. *Plant Growth Regulation* 20: 125-134

[www.arabidopsis.org/](http://www.arabidopsis.org/)

**Zhang ZL, Xie Z, Zou X, Casaretto J, Ho TH, Shen QJ** (2004) A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiology* 134:1500-1513

## **Agradecimientos**

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigaciones Biológicas del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en Madrid, España; bajo la asesoría del Dr. Julio Salinas Muñoz.

## 6. CONCLUSIONES

1. Las categorías funcionales en las que fueron clasificados los ESTs obtenidos en este trabajo, muestran que los genes de respuesta al estrés hídrico y al estrés por calor en *Opuntia streptacantha* están involucrados en diferentes procesos celulares tales como señalización, metabolismo, fotorrespiración y fotosíntesis entre otros.
2. La presencia del receptor de sistemina SR160 en *Opuntia streptacantha* en respuesta a estrés hídrico y calor sugiere que la vía de señalización de sistemina participa en respuesta a estrés abiótico.
3. El factor de iniciación de la traducción *sui1* tiene al menos dos isoformas en *Opuntia streptacantha* con una identidad del 71.4%
4. En el RNA mensajero de la subunidad alfa de la fosfofructocinasa dependiente de pirofosfato se retiene un intrón mediante un evento de procesamiento alternativo. Esta variante del transcrito es expresado únicamente en condiciones de estrés hídrico y calor en *Opuntia streptacantha*, lo que sugiere su participación en respuesta a estrés abiótico.
5. La acumulación de prolina en nopal durante la sequía, calor y salinidad, sugiere que este aminoácido funciona como un osmolito y juega un papel crítico en la protección de la actividad fotosintética particularmente durante el estrés salino.

6. El gen At1g16180 (tumour differentially expressed (TDE) family protein/TMS membrana family protein) no es esencial en respuesta al estrés abiótico en *Arabidopsis thaliana*.

## 7. PERSPECTIVAS

### 1. Probar

a. Si las líneas insercionales en el ORF del gen At3g12830 o mutantes mediante la técnica de RNA de interferencia para el mismo gen, muestran un fenotipo en el estrés abiótico o biótico dados los antecedentes en microarreglos de *A. thaliana*.

b. Si una doble mutante para el gen At1g16180 y su homólogo At3g06170 produce un fenotipo particular en condiciones de estrés abiótico.

2. Buscar para el caso de los genes At5g49230:salk\_087868, At5g49230:salk\_113695 y At5g56550:cs824310, líneas homocigotas en la segunda generación y analizar el fenotipo.

## 8. REFERENCIAS

Aguado-Santacruz GA, 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

Ahmed FE, Hall AE (1993) Heat injury during early floral bud development in cowpea. *Crop Science* 33: 764-767

Alexandersson E, Fraysse L, Sjøvall-Larsen S, Gustavsson S, Fellert M, Karlsson M, Johanson U, Kjellbom P (2005) Whole gene family expression and drought stress regulation of aquaporins. *Plant Molecular Biology* 59: 469-484

Al-Khatib K, Paulsen GM (1999) High-temperature effects on photosynthetic processes in temperate and tropical cereals. *Crop Science* 39: 119-125

Alscher RG, Donahue JL, Cramer CL (1997) Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiologia Plantarum* 100: 224-233

Anderson JV, Davis DG (2004) Abiotic stress alters transcript profiles and activity of glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase in *Euphorbia esula*. *Physiologia Plantarum* 120: 421-433

Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in *Arabidopsis*. *Science* 285: 1256 - 1258

Arnon DI (1949) Cooper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenol oxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24: I-15



Bahrn A, Jensen CR, Asch F, Mogensen O (2002) Drought-induced changes in xylem pH, ionic composition and ABA concentration act as early signals in field-grown maize (*Zea mays* L.). *Journal of Experimental Botany* 53: 251-263

Bala G, Caldeira K, Wickett M, Phillips TJ, Lobell DB, Delire C, Mirin A (2007) Combined climate and carbon-cycle effects of large-scale deforestation. *Proceedings of the National Academy of Science* 104: 6550–6555

Barbera G (1995) History, economic and agro-ecological importance. In: Barbera G, Inglese P, Pimienta EB y Arias JE. (Eds.). *Agro-ecology, cultivation and uses of cactus pear*. FAO. Roma, Italy. pp. 1-11

Bartels D, Salamini F (2001) Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Plant Physiology* 127:1346-53

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

Blumwald E, Gelli A (1997) Secondary inorganic ion transport in plant vacuoles. *Advances in Botanical Research* 25: 401-407

Bohnert HJ, Cushman JC (2000) The ice plant cometh: Lessons in abiotic stress tolerance. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 334-346

Bösl B, Grimminger V, Walter S (2006) The molecular chaperone Hsp104 - a molecular machine for protein disaggregation. *Journal of Structural Biology* 156:139-148

Bouchereau A, Aziz A, Larher F, Martin-Tanguy J (1999) Polyamines and plant environmental challenges: recent development. *Plant Science* 140: 103-125

Boyer JS (1982) Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448

Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry* 72: 248-254

Bravo-Hollis HH (1978) *Las Cactáceas de México*. Vol. 1. Universidad Nacional Autónoma de México, 743 pp

Bravo LA, Gallardo J, Navarrete A, Olave N, Martinez J, Alberdi M, Close TJ, Corcuera LJ (2003) Cryoprotective activity of a cold-induced dehydrin purified from barley. *Physiologia Plantarum* 118:262-269

Bukhov NG, Wiese C, Neimanis S, Heber U (1999) Heat sensitivity of chloroplasts and leaves: leakage of protons from thylakoids and reversible activation of cyclic electron transport. *Photosynthesis Research* 59: 81–93

Camejo D, Rodriguez P, Morales MA, Dell'amico JM, Torrecillas A, Alarcon JJ (2005) High temperature effects on photosynthetic activity of two tomato cultivars with different heat susceptibility. *Journal of Plant Physiology* 162: 281–289

Capell T, Bassie L, Christou P (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 9909-9914

Chattopadhyay MK, Tiwari BS, Chattopadhyay G, Bose A, Sengupta DN, Ghosh B (2002) Protective role of exogenous polyamines on salinity-stressed rice (*Oryza sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* 116: 192-199

Chaves MM (1991) Effects of water deficits on carbon assimilation. *Journal of Experimental Botany* 42: 1-16

Chavez MM, Maroco JP, Pereira JS (2003) Understanding plant responses to drought – from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239-264

Danyluk J, Houde M, Rassart E, Sarhan F (1994) Differential expression of a gene encoding an acidic dehydrin in chilling sensitive and freezing tolerant Gramineae species. *FEBS letters* 344: 20–24

Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N, Sarhan F (1998) Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell* 10: 623–638

Dash M, Panda SK (2001) Salt stress induced changes in growth and enzyme activities in germinating *Phaseolus mungo* seeds. *Biologia Plantarum* 44: 587-589

Dat JF, Foyer CH, Scott IM (1998) Changes in salicylic acid and antioxidants during induction of thermo tolerance in mustard seedlings. *Plant Physiology* 118: 1455–1461

Davies WJ, Tardieu F, Trejo CL (1994) How do chemical signals work in plants that grow in drying soil? *Plant Physiology* 104: 309-314

Delauney AJ, Verma DPS (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 4: 215-223

Demmig-Adams B, Adams WW III (1996) The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* 1: 21-26

Dure L, Chlan C (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination. XII. Purification and properties of principal storage proteins. *Plant Physiology* 68: 180–186

Ehleringer J, Forseth I (1980) Solar tracking by plants. *Science* 210: 1094-1098

Foyer CH, López-Delgado H, Dat JF, Scott IM (1997) Hydrogen peroxide and glutathione associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum* 100: 241–54

Frensch J (1997) Primary responses of root and leaf elongation to water deficits in the atmosphere and soil solution. *Journal of Experimental Botany* 48: 985–999

Galau GA, Hughes DW, Dure III L (1986) Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Lea) mRNAs. *Plant Molecular Biology* 7: 155-170

Galston AW, Kaur Sawhney R (1990) Polyamines in plant physiology. *Plant Physiology* 94: 406–410

Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garciarrubio A, Covarrubias AA (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *The journal of Biological Chemistry* 275: 5668–5674

Gong M, Chen SN, SongYQ, Li ZG (1997) Effect of calcium and calmodulin on intrinsic heat tolerance in relation to antioxidant systems in maize seedlings. *Australian Journal of Plant Physiology* 24: 371–379

Grelet J, Benamar A, Teyssier E, Avelange-Macherel M-H, Grunwald D, Macherel D (2005) Identification in pea seed mitochondria of a late-embryogenesis abundant protein able to protect enzymes from drying. *Plant Physiology* 137:157-167

Guilioni L, Wery J, Tardieu F (1997) Heat stress-induced abortion of buds and flowers in pea: is sensitivity linked to organ age or to relations between reproductive organs? *Annals of Botany* 80, 159–168

Guzmán U, Arias S y Dávila P (2003) Catálogo de cactáceas mexicanas. Univ. Nacional Autónoma de México y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México. 315 pp

Ha HC, Yager JD, Woster PA, Casero RA Jr (1998) Structural specificity of polyamines and polyamine analogues in the protection of DNA from strand breaks induced by reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 244: 298–303

Halfter U, Ishitani M, Zhu JK (2000) The *Arabidopsis* SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 3735–3740

Hall AE (1992) Breeding for heat tolerance. *Plant Breeding Reviews* 10: 129-168

Hartl FU, Hayer-Hartl M (2002) Protein folding - Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* 295: 1852-1858

Haslbeck M (2002) sHsps and their role in the chaperone network. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59: 1649-1657

Havaux M, Tardy F (1999) Loss of chlorophyll with limited reduction of photosynthesis as an adaptative response of Syrian barley landraces to high-light and heat stress. *Australian Journal of Plant Physiology* 26: 569-578

Hayzer DJ, Leisinger T (1980) The gene-enzyme relationships of proline biosynthesis in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* 118: 287-293

Hetherington AM (2001) Guard cell signalling. *Cell* 107: 711-714

Heyne EG, Brunson AM (1940) Genetic studies of heat and drought tolerance in maize. *J. Am. Soc. Agro* 32: 803-814

Hoagland DR, Arnon DI (1950) The water-culture method for growing plants without soil, Univ. of California Agric. Exp. Stn. Circ. 347. Univ. of California, Berkeley, CA

Horvath G, Arellano JB, Droppa M, Baron M (1998) Alterations in photosystem II electron transport as revealed by thermoluminescence of Cu-poisoned chloroplasts. *Photosynthesis Research* 57: 175–181

Hu CAA, Delauney AJ, Verma DPS (1992) A bifunctional enzyme ( $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89: 9354-9358

Igarashi Y, Yoshiba Y, Sanada Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Wada K, Shinozaki K (1997) Characterization of the gene for  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase and correlation between the expression of the gene and salt tolerance in *Oryza sativa* *Plant Molecular Biology* 33: 857-865

Inan G, Zhang Q, Li P, Wang Z, Cao Z, Zhang H, Zhang C, Quist TM, Goodwin SM, Zhu J, Shi H, Damsz B, Charbaji T, Gong Q, Ma S, Fredricksen M, Galbraith DW, Jenks MA, Rhodes D, Hasegawa PM, Bohnert HJ, Joly RJ, Bressan RA, Zhu JK (2004) Salt Cress. A halophyte and cryophyte *Arabidopsis* relative

model system and its applicability to molecular genetic analyses of growth and development of extremophiles. *Plant Physiology* 135: 1718-1737

IPCC, 2007: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor and H.L. Miller (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA, 996 pp

Ishitani M, Liu J, Halfter U, Kim C-S, Shi W, Zhu J-K (2000) SOS3 function in plant salt tolerance requires N-myristoylation and calcium binding. *Plant Cell* 12: 1667-1677

Ismail AM, Hall AE (1999) Reproductive-stage heat tolerance, leaf membrane thermostability and plant morphology in cowpea. *Crop Science* 39: 1762–1768

Ismail AM, Hall AE, Close TJ (1999) Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiology* 120: 237–244

Jang JY, Kim DG, Kim YO, Kim JS, Kang H (2004) An expression analysis of a gene family encoding plasma membrane aquaporins in response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 54: 713–725

Jiménez-Bremont JF, Becerra-Flora A, Hernández-Lucero E, Rodríguez-Kessler M, Acosta Gallegos JA, Ramírez-Pimentel JG (2006) Proline accumulation in two bean cultivars under salt stress and the effect of polyamines and ornithine. *Biologia Plantarum* 50: 763-766

Jordan B, Sottosanto A, Gelli, Blumwald E (2004) DNA array analyses of *Arabidopsis thaliana* lacking a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter: impact of AtNHX1 on gene expression. *The Plant Journal* 40: 752–771

Karim MA, Fracheboud Y, Stamp P (1997) Heat tolerance of maize with reference of some physiological characteristics. *Annual Bangladesh Agriculture* 7: 27–33

Kasukabe Y, He L, Nada K, Misawa S, Ihara I, Tachibana S (2004) Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stress-regulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 45: 712–722

Kavi Kishor PBK, Hong Z, Miao G-H, Hu C-AA, Verma DPS (1995) Overexpression of  $\Delta^1$ -pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology* 108: 1387-1394

Kavi Kishor PB, Sangam S, Amrutha RN, Sri Laxmi P, Naidu KR, Rao KRSS, Rao S, Reddy KJ, Theriappan P, Sreenivasulu N (2005) Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88: 424-438

Kiyosue T, Yoshiba Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1996) A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 8: 1323-1335



Kotak S, Larkindale J, Lee U, Koskull-Döring PV, Vierling E, Scharf KD (2007) Complexity of the heat stress response in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 10: 310–316

Kotchoni SO, Gachomo EW, Betiku E, Shonukan OO (2003) A home made kit for plasmid DNA miniprep. *African Journal Biotechnology* 2: 86-87

Kratsch HA, Wise RR (2000) The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell and Environment* 23: 337-350

Larkindale J, Hall JD, Knight MR, Vierling E (2005) Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiology* 138: 882-897

Larkindale J, Huang B (2004) Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *Journal of Plant Physiology* 161: 405-413

Li B, Liu HT, Sun DY, Zhou RG (2004) Ca<sup>2+</sup> and calmodulin modulate DNA-binding activity of maize heat shock transcription factor in vitro. *Plant and Cell Physiology* 45: 627-634

Lichtenthaler HK (1998) The stress concept in plants: an introduction. *Annals of the New York academy of Sciences* 851: 187-198

Liu HT, Gao F, Cui SJ, Han JL, Sun DY, Zhou RG (2006a) Primary evidence for involvement of IP<sub>3</sub> in heat-shock signal transduction in *Arabidopsis*. *Cell Research* 16: 394-400

Liu HT, Li GL, Chang H, Sun DY, Zhao RG, Li B (2007a) Calmodulin binding protein phosphatase PP7 is involved in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant, Cell and Environment* 30: 156-164

Liu HT, Liu YY, Pan QH, Yang HR, Zhan JC, Huang WD (2006b) Novel interrelationship between salicylic acid, abscisic acid, and PIP<sub>2</sub>-specific phospholipase C in heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves. *Journal of Experimental Botany* 57: 3337-3347

Liu HT, Sun DY, Zhou RG (2005) Ca<sup>2+</sup> and AtCaM3 are involved in the expression of heat shock protein gene in Arabidopsis. *Plant, Cell and Environment* 28:1276-1284

Liu JH, Kitashiba H, Wang J, Ban Y, Moriguchi T (2007b) Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnology* 24:117-126

Liu J, Ishitani M, Halfter U, Kim CS, Zhu JK (2000) The *Arabidopsis thaliana* SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97: 3730–3734

Liu J, Zhu JK (1998) A calcium sensor homolog required for plant salt tolerance. *Science* 280: 1943-1945

Liu X, Huang B (2000) Heat stress injury in relation to membrane lipid peroxidation in creeping bent grass. *Crop Science* 40: 503–510

Luo M, Liu JH, Mahapatra S, Hiu RD, Mahapatra SS (1992) Characterization of a gene family encoding abscisic acid- and environmental stress-inducible proteins of alfalfa. *The Journal of Biological Chemistry* 267: 432–436

Maestri E, Klueva N, Perrotta C, Gulli M, Nguyen HT, Marmioli N (2002) Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Molecular Biology* 48: 667-681

Magne C, Larher F (1992) High sugar content of extracts interferes with colorimetric determination of amino acids and free proline. *Analytical Biochemistry* 200: 115-118

Mahajan S, Sopoy SK, Tuteja N (2006a) CBL-CIPK paradigm: Role in calcium and stress signaling in plants. *Proc. Indian Natn. Sci Acad.* 72: 63–78

Mahajan S, Sopoy SK, Tuteja N (2006b) Cloning and characterization of CBL-CIPK signaling components from a legume (*Pisum sativum*). *The FEBS Journal* 273: 907–925

Mahajan S, Tuteja N (2005) Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444: 139–158

Maurel C, Verdoucq L, Luu DT, Santoni V (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology* 59: 595-624

Mittler R (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410

Mittler R (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11: 15-19

Mittler R, Merquiol E, Hallak-Herr E, Rachmilevitch S, Kaplan A, Cohen M (2001) Living under a dormant canopy: a molecular acclimation mechanism of the desert plant *Retama raetam*. *The Plant Journal* 25: 407-416

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497

Muscari C, Guarnieri C, Stefanelli C, Giaccari A, Caldarera CM (1995) Protective effect of spermine on DNA exposed to oxidative stress. *Molecular and Cellular Biochemistry* 144: 125–9

Neumann PM (1993) Rapid and reversible modifications of extension capacity of cell walls in elongating maize leaf tissues responding to root addition and removal of NaCl. *Plant, Cell and Environment* 16: 1107–1114

Niyogi KK (1999) Photoprotection revisited: genetic and molecular approaches. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 333–359

Nobel PS (1988) *Environmental biology of agaves and cacti*. Cambridge University Press, New York

Omid S, Abolghasem MS, Saeid A, Mohammad M, Reza SM (2006) Inheritance of cold tolerance in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 30: 399-405

Park HY, Seok HY, Park BK, Kim SH, Goh CH, Lee BH, Lee CH, Moon YH (2008) Overexpression of *Arabidopsis* ZEP enhances tolerance to osmotic stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 375: 80-85

Passioura JB, Munns R (2000) Rapid environmental changes that affect leaf water status induce transient surges or pauses in leaf expansion rate. *Australian Journal of Plant Physiology* 27: 941–948

Pelham HRB (1982) A regulatory upstream promoter element in the *Drosophila* hsp70 heat/shock gene. *Cell* 30: 517-528

Piatkowski D, Schneider K, Salamini F, Bartels D (1990) Characterization of five abscisic acid-responsive cDNA clones isolated from the desiccation-tolerant

plant *Craterostigma plantagineum* and their relationship to other water-stress genes. *Plant Physiology* 94:1682-1688

Pimienta E (1990) El nopal tunero. Universidad de Guadalajara, Guadalajara Jalisco, México

Platten DJ, Cotsaftis O, Berthomieu P, Bohnert H, Davenport RJ, Fairbairn DJ, Horie T, Leigh RA, Lin HX, Luan S, Maser P, Pantoja O, Rodriguez-Navarro A, Schachtman DP, Schroeder JI, Sentenac H, Uozumi N, Very AA, Zhu JK, Dennis ES, Tester M (2006) Nomenclature for HKT transporters, key determinants of plant salinity tolerance. *Trends in Plant Science* 11: 372–374

Plieth C (1999) Temperature sensing by plants: calcium-permeable channels as primary sensors-a model. *The Journal of Membrane Biology* 172: 121–127

Postel SL (2000) Entering a new era of water scarcity. The challenges ahead. *Ecological Applications* 10: 941-948

Puhakainen T, Hess MW, Makela P, Svensson J, Heino P, Palva ET (2004a) Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 54: 743–753

Qiu QS, Guo Y, Quintero FJ, Pardo JM, Schumaker KS, Zhu JK (2004) Regulation of vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in *Arabidopsis thaliana* by the salt-overly-sensitive (SOS) pathway. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 207-215

Rebman JP, Pinkava DJ (2001) *Opuntia* cacti of north America- an overview. *Florida Entomologist* 84: 474-483

Reiser V, Raitt DC, Saito H (2003) Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *The Journal of Cell Biology* 161: 1035-1040

Reyes-Agüero JA, Aguirre-Rivera JR, Hernández HM (2005) Systematic notes and a detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L.) MILL. (CACTACEAE). *Agrociencia* 39:395-408

Reyes JL, Rodrigo MJ, Colmenero-Flores JM, Gil JV, Garay-Arroyo A, Campos F, Salamini F, Bartels D, Covarrubias AA (2005) Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell and Environment* 28:709-718

Reynolds JF, Stafford SDM, Lambin EF, Turner BL, Mortimore M, Batterbury SPJ, Downing TE, Dowlatabadi H, Fernández RJ, Herrick JE, Huber-Sannwald E, Jiang H, Leemans R, Lynam T, Maestre FT, Ayarza M, Walker B (2007) Global desertification: Building a science for dryland development. *Science* 316: 847-851

Rhodes D, Hanson AD (1993) Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 44: 357-384

Rizhsky L, Hongjian L, Mittler R (2002) The combined effect of drought stress and heat shock on gene expression in tobacco. *Plant Physiology* 130: 1143-1151

Rodríguez HG, Roberts JKM, Jordan WR, Drew MC (1997) Growth, water relations, and accumulation of organic and inorganic solutes in roots of maize seedlings during salt stress. *Plant Physiology* 113: 881–893

Rodríguez-Kessler M, Alpuche-Solís AG, Ruiz OA, Jiménez-Bremont JF (2006) Effect of salt stress on the regulation of maize (*Zea mays* L.) genes involved in polyamine biosynthesis. *Plant Growth Regulation* 48: 175-185

Rosegrant MW, Cline SA (2003) Global food security: challenges and policies. *Science* 302: 1917–1919

Sanchez-Ballesta MT, Rodrigo MJ, Lafuente MT, Granell A, Zacarias L (2004) Dehydrin from *Citrus*, which confers in vitro dehydration tolerance and freezing protection activity, is constitutive and highly expressed in the flavedo of fruit but responsive to cold and water stress in leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52:1950-1957

Sangwan V, Dhindsa RS (2002) In vivo and in vitro activation of temperature responsive plant map kinases. *FEBS Letters* 531: 561–564

Savouré A, Hua X-J, Bertauche N, Van Montagu M, Verbruggen N (1997) Abscisic acid-independent and abscisic acid-dependent regulation of proline biosynthesis following cold and osmotic stresses. *Molecular and General Genetics* 254: 104-109

Sawahel WA, Hassan AH (2002) Generation of transgenic wheat plants producing high levels of the osmoprotectant proline. *Biotechnology Letters* 24: 721-725

Scheinvar L (1995) Taxonomy of utilized *Opuntias*. In: G. Barbera, P. Inglese and E. Pimienta B. *Agroecology, cultivation and uses of cactus pear*. FAO Plant Production and Protection Paper 132. Rome, Italy

Seckler D, Randolph B, Upali A (1999) Water scarcity in the twenty-first century. *International Journal of Water Resources Development* 15: 29-42

Shao HB, Chu LY, Shao MA, Jaleel CA, Mi HM (2008) Higher plant antioxidants and redox signalling under environmental stresses. *Comptes Rendus Biologies* 331: 433-441

Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK (2000) The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 97: 6896-6901

Sivamani E, Bahieldrin A, Wraith JM, Al-Niemi T, Dyer WE, Ho THD, Qu R (2000) Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene. Plant Science 155:1–9

Soll J, Schleiff E (2004) Protein import into chloroplasts. Nature reviews. Molecular Cell Biology 5: 198-208

Sreenivasulu N, Sopory SK, Kavi Kishor PB (2007) Deciphering the regulatory mechanisms of abiotic stress tolerance in plants by genomic approaches. Gene 388: 1-13

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, pp. 243-291

Strizhov N, Abraham E, Okresz L, Blickling S, Zilberstein A, Schell J, Konez C, Szabados L (1997) Differential expression of two *P5CS* genes controlling proline accumulation during salt-stress requires ABA and is regulated by *ABA1*, *ABI1* and *AXR2* in *Arabidopsis*. The Plant Journal 12: 557-569

Sung DY, Kaplan F, Lee KJ, Guy CL (2003) Acquired tolerance to temperature extremes. Trends in Plant Science 8: 179–187

Swindell WR, Huebner M, Weber AP (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



Szabolcs I (1994) Soils and salinisation. In Handbook of Plant and Crop Stress (ed. M. Pessarakali), pp. 3–11. Marcel Dekker, New York

Székely G, Abrahám E, Cséplő A, Rigó G, Zsigmond L, Csiszár J, Ayaydin F, Strizhov N, Jásik J, Schmelzer E, Koncz C, Szabados L (2007) Duplicated P5CS genes of Arabidopsis play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* 53: 11-28

Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1596-1599

Tamura T, Hra K, Yamaguchi Y, Koizumi N, Sano H (2003) Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiology* 131: 454-462

Tissieres A, Mitchell HK, Tracy UM (1974) Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*. Relation to chromosome puffs. *Journal of Molecular Biology* 84: 389-398

Tripathi SB, Gurumurthi K, Panigrahi AK, Shaw BP (2007) Salinity induced changes in proline and betaine contents and synthesis in two aquatic macrophytes differing in salt tolerance. *Biologia Plantarum* 51: 110-115

Uehara Y, Takahashi Y, Berberich T, Miyazaki A, Takahashi H, Matsui K, Ohme-Takagi M, Saitoh H, Terauchi R, Kusano T (2005) Tobacco ZFT1, a transcriptional repressor with a Cys2/His2 type zinc finger motif that functions in spermine-signaling pathway. *Plant Molecular Biology* 59: 435-448

United Nations Population Division (1998) World population prospects 1950-2050 (The 1998 revision). United Nations, New York, United States

Urao T, Yakubova B, Satoha R, Yamaguchi-Shinozaki K, Sekib M, Hirayama T, Shinozaki K (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *The Plant Cell* 11: 1743-1754

Verbruggen N, Villarroel R, Van Montagu M (1993) Osmoregulation of a pyrroline-5-carboxylate reductase gene in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 103: 771-781

Verma S, Mishra SN (2005) Putrescine alleviation of growth in salt stressed *Brassica juncea* by inducing antioxidative defense system. *Journal of Plant Physiology* 162: 669-677

Vollenweider P, Gunthardt-Goerg MS (2005) Diagnosis of abiotic and biotic stress factors using the visible symptoms in foliage. *Environmental Pollution* 137: 455–465

Wahid A, Close TJ (2007) Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves. *Biologia Plantarum* 51: 104–109

Wahid A, Gelani S, Ashraf M, Foolad MR (2007) Heat tolerance in plants: an overview. *Environmental and Experimental Botany* 61: 199-223

Wegele H, Müller L, Buchner J (2004) Hsp70 and Hsp90 - a relay team for protein folding. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 151: 1-44

Wi SJ, Kim WT, Park KY (2006) Overexpression of carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Reports* 25: 1111-1121

Wilkinson S, Davies WJ (2002) ABA-based chemical signalling: the coordination of responses to stress in plants. *Plant, Cell and Environment* 25: 195-210

Wohlbach DJ, Quirino BF, Sussman MR (2008) Analysis of the *Arabidopsis* histidine kinase ATHK1 reveals a connection between vegetative osmotic stress sensing and seed maturation. *Plant Cell*. 20:1101-17

Xu D, Duan X, Wang B, Hong B, Ho T, Wu R (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant physiology* 110: 249–257

Xu J, Tian J, Belanger FC, Huang B (2007) Identification and characterization of an expansin gene *AsEXP1* associated with heat tolerance in *C<sub>3</sub>* *Agrostis* grass species. *Journal of Experimental Botany* 58: 3789-3796

Xu S, Li J, Zhang X, Wei H, Cui L (2006) Effects of heat acclimation pretreatment on changes of membrane lipid peroxidation, antioxidant metabolites, and ultrastructure of chloroplasts in two cool-season turf grass species under heat stress. *Environmental and Experimental Botany* 56: 274–285

Yeo AR, Lee KS, Izard P, Boursier PJ, Flowers TJ (1991) Short- and long-term effects of salinity on leaf growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Experimental Botany* 42: 881–889

Yoshida Y, Kiyosue T, Katagiri T, Ueda H, Mizoguchi T, Yamaguchi-Shinozaki K, Wada K, Harada Y, Shinozaki K (1995) Correlation between the induction of a gene for  $\Delta$ 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase and the accumulation of proline in *Arabidopsis thaliana* under osmotic stress. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* 7: 751-760

Young JC, Barral JM, Hartl UF (2003) More than folding: localized functions of cytosolic chaperones. *Trends in Biochemical Sciences* 28: 541-547

Zhang T, Liu Y, Yang T, Zhang L, Xu S, Xue L, An L (2006) Diverse signals converge at MAPK cascades in plant. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 274–283

Zhang Y, Rouf-Mian MA, Chekhovskiy K, So S, Kupfer D, Lai H, Roe BA (2005) Differential gene expression in *Festuca* under heat stress conditions. *Journal of Experimental Botany* 56: 897-907

Zhu JK (2001) Plant salt tolerance. *Trends in Plant Science* 6: 66-71

Zhu JK (2002) Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247–273