

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

POSGRADO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**“Caracterización molecular y funcional de genes
que codifican proteínas de choque térmico de
plantas bajo condiciones de estrés abiótico”**

Tesis que presenta

Silvia Salas Muñoz

Para obtener el grado de

Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular

Director de la Tesis:

Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont

San Luis Potosí, S.L.P., Julio del 2010



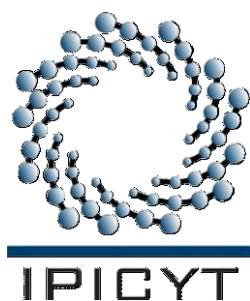
Constancia de aprobación de la tesis

La tesis **Caracterización molecular y funcional de genes de plantas que codifican proteínas de choque térmico**, presentada para obtener el Grado de de Maestro(a) en Ciencias en Biología Molecular fue elaborada por **Silvia Salas Muñoz** y aprobada el **12 de Julio de 2010** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de División la de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

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

Dra. Irene Beatriz Castaño Navarro
(Asesor de la tesis)

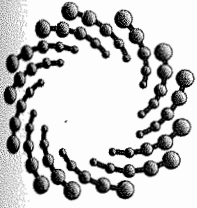
Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler
(Asesor de la tesis)



Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Biología Molecular de hongos y de plantas de la División de Biología Molecular del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la dirección del **Dr. Juan Francisco Jiménez Bremont**.

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



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

IPICYT

Acta Núm. 072

Nombre del Sustentante:

SILVIA

SALAS

MUNOZ



Firma

Acta de Examen de Grado

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

DRA. IRENE BEATRIZ CASTAÑO NAVARRO PRESIDENTA
DR. JUAN FRANCISCO JIMENEZ BREMONT SECRETARIO
DRA. MARGARITA RODRIGUEZ Y DOMINGUEZ K SINODAL

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de Maestro (a) en Ciencias en Biología Molecular, sustentó el (la)

c. SILVIA SALAS MUÑOZ

sobre la Tesis intitulada: CARACTERIZACION MOLECULAR Y FUNCIONAL DE GENES QUE CODIFICAN PARA PROTEINAS DE CHOQUE TERMICO DE PLANTAS BAJO CONDICIONES DE ESTRES ABIOTICO

que se desarrolló bajo la dirección de: DR. JUAN FRANCISCO JIMENEZ BREMONT

El Jurado, después de deliberar, determinó:

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 19:45 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fé el Secretario Académico del Instituto.

Presidente

Secretario

Margarita Rodríguez y Domínguez K
Sinodal

Sinodal

Sinodal



Manuel González
Secretario Académico

DEDICATORIAS

- A Dios** Por permitirme existir
- A mis padres** Dr. Miguel Ángel Salas Luévano y Lic. Silvia Muñoz Delgado, quienes con su comprensión, su paciencia y su apoyo incondicional en estos momentos difíciles, he logrado mi superación profesional y personal, para ellos todo mi amor eterno y mi respeto.
- A mis hermanas** Karina y Paloma que son parte fundamental en mi vida, gracias por su apoyo, su amor y su amistad.
- A mis sobrinos** Luis Ángel y Karina Fernanda, quienes son mi adoración y mi fuerza para seguir adelante, y a quienes amo.
- A mi novio** Armando Mauricio por su amor y apoyo en estos momentos de mi realización profesional.
- A la familia** Muñoz Delgado por su apoyo y comprensión, y Salas Luévano por su apoyo fraternal.
- A mis amigos** Nancy G., José Luis, Dioce, Claudia y Nancy P. por su amistad y apoyarme y estar conmigo durante casi 14 años de conocernos.
- Al Doctor** Juan Francisco Jiménez, por su apoyo, sus consejos y su paciencia para la realización de mi tesis, y por dejarme convivir con su familia.

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

A la Dra. Margarita Rodríguez y Domínguez Kessler y a la Dra. Irene Beatriz Cataño Navarro, por su valiosa asesoría y excelentes aportaciones para la composición final de mi tesis.

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

Al Dr. Neftalí Ochoa Alejo por haber permitido hacer una estancia en su laboratorio del CINVESTAV-Irapuato.

A mis compañeros y amigos de generación: Jorge Sáenz, Francisco Pérez y Karla Sánchez, por sus consejos, apoyo moral e intelectual, por su grata convivencia y nuestra amistad.

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

A mis compañeros de laboratorio 7 y la MC Alicia Becerra Flora por su apoyo técnico.

ÍNDICE

	Página
Constancia de aprobación de la tesis	ii
Créditos institucionales	iii
Acta de examen	iv
Dedicatorias	v
Agradecimientos	vi
Lista de tablas	x
Lista de figuras	xi
Abreviaturas	xiv
Resumen	xvii
Abstract	xx

	Página
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Estrés en plantas	1
1.1.1 Estrés abiótico	2
1.1.2 Respuesta de la planta al estrés abiótico	3
1.2 Proteínas de choque térmico (HSPs)	7
1.2.1 Proteínas co-chaperonas HSP40 (DnaJ)	8
1.2.1.1 Estructura de las proteínas HSP40 (DnaJ)	8
1.2.1.2 Clasificación de las proteínas HSP40 (DnaJ)	9
1.2.1.3 Mecanismo de regulación de las proteínas HSP70 (DnaK) por las co-chaperonas HSP40 (DnaJ) y HSP60 (GrpE)	10
1.2.2 Proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSP)	11
1.2.2.1 Oligomerización de las proteínas sHSP	13
1.2.2.2 Mecanismo de acción de las chaperonas sHSP	14
1.2.2.3 Expresión de las sHSP bajo condiciones de estrés abiótico	15
1.3 <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
II. OBJETIVO	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1 Materiales biológicos	22

3.1.1 <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
3.1.2 Microorganismos	23
3.2 Vectores	23
3.3 Oligonucleótidos	27
3.4 Manipulación de tejido vegetal	28
3.4.1 Esterilización de semillas	28
3.4.2 Germinación de semillas	28
3.4.3 Experimentos bajo condiciones de estrés abiótico	28
3.4.4 Polinización dirigida para la obtención de la cruce de <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
3.5 Técnicas de transformación genética	30
3.5.1 Transformación de células bacterianas	30
3.5.2 Transformación de <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
3.5.3 Selección de líneas transgénicas de la transformación de <i>A. thaliana</i>	31
3.6 Técnicas moleculares	32
3.6.1 Extracción de DNA genómico de hojas de <i>Arabidopsis thaliana</i>	32
3.6.2 Extracción del DNA plasmídico de células bacterianas	32
3.6.3 Extracción de RNA de <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
3.6.4 Digestión del DNA con enzimas de restricción	33
3.6.5 Reacción de ligación de DNA	33
3.6.6 Recombinación del Sistema Gateway mediante la enzima LR Clonasa® II	34
3.6.7 Purificación de DNA por columna	34
3.6.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	35
3.6.9 Transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)	35
IV. RESULTADOS	36
4.1 DnaJ: genes At5g22060 (<i>AtDJ2</i>) y At3g44110 (<i>AtDJ3</i>)	36
4.1.1 Alineamiento del EST (SSHPv-S38) aislado de la biblioteca sustractiva de frijol con DnaJ de <i>Arabidopsis thaliana</i>	36

4.1.2 Análisis <i>in silico</i> de los genes At5g22060 y At3g44110 que codifican proteínas DnaJ	37
4.1.3 Identificación de las líneas homocigotas mutantes insercionales de T-DNA de los genes <i>AtDJ2</i> y <i>AtDJ3</i>	43
4.1.4 Ensayos de RT-PCR de las líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes <i>AtDJ2</i> y <i>AtDJ3</i>	45
4.1.5 Doble mutante de las líneas insercionales de T-DNA de los genes <i>AtDJ2</i> y <i>AtDJ3</i>	46
4.1.6 Análisis del fenotipo de las mutantes sencillas (<i>atdj2</i> y <i>atdj3</i>) y la doble mutante (<i>atdj2-atdj3-46</i>) bajo condiciones de estrés abiótico	50
4.1.7 Sobreexpresión del gen <i>AtDJ2</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	52
4.1.8 Construcción del vector bait (pDHB1-AtDJ2) para el sistema de dos híbridos	54
4.2 Gen <i>OpsHSP18</i> de <i>Opuntia streptacantha</i>	58
4.2.1 Análisis de la expresión del gen <i>OpsHSP18</i> en <i>O. streptacantha</i> bajo condiciones de estrés abiótico	62
4.2.2 Sobreexpresión del gen <i>OpsHSP18</i> en <i>A. thaliana</i>	63
4.2.3 Análisis del fenotipo de la sobreexpresante del gen <i>OpsHSP18</i> en <i>A. thaliana</i> bajo condiciones de estrés abiótico	67
V. DISCUSIÓN	69
VI. PERSPECTIVAS	75
VII. ANEXO	76
VIII. BIBLIOGRAFÍA	80

LISTA DE TABLAS

Tabla	Descripción	Página
1	Lista de semillas	22
2	Lista de Microorganismos	23
3	Lista de Vectores	24
4	Lista de construcciones	25
5	Lista de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes	27
6	Condiciones de los experimentos bajo estrés abiótico	29

LISTA DE FIGURAS

Figura	Descripción	Página
1	Respuesta de la planta al estrés abiótico	6
2	Principales familias de proteínas de choque térmico (HSP)	7
3	Estructura de las proteínas HSP40 (DnaJ)	9
4	Clasificación de las proteínas HSP40 (DnaJ)	10
5	Mecanismo de regulación de las proteínas HSP70 (DnaK) por las co-chaperonas HSP40 (DnaJ) y HSP60 (GrpE)	11
6	Dominios de las proteínas sHSP	12
7	Complejo de oligomerización de las proteínas sHSP	13
8	Mecanismo de acción de las proteínas sHSP	15
9	Cruza de las líneas 1 y 2 de <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
10	Recombinación del Sistema Gateway mediante la enzima LR Clonasa® II.	34
11	Alineamiento tipo Clustal W de la secuencia SSHPv-S38 del frijol con las proteínas DnaJ de <i>A. thaliana</i>	36
12	Esquematización de la organización genómica y alineamiento de las proteínas de las DnaJ	38
13	Alineamiento tipo Clustal W de las proteínas DnaJ	40
14	Patrón de expresión de los genes <i>AtDJ2</i> y <i>AtDJ3</i> de <i>A. thaliana</i>	41
15	Cajas o secuencias regulatorias presentes en los promotores de los genes <i>AtDJ2</i> y <i>AtDJ3</i>	43
16	Localización de la inserción de T-DNA en las líneas insercionales Salk_071563 (<i>AtDJ2</i>) y Salk_132923 (<i>AtDJ3</i>)	44
17	Homocigosis de las líneas insercionales de T-DNA de los genes At5g22060 (<i>AtDJ2</i>) y At3g44110 (<i>AtDJ3</i>)	45
18	RT-PCR de las líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes <i>AtDJ2</i> y <i>AtDJ3</i>	46
19	PCR de la primera generación filial (F1) de la cruce de las	48

	líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes <i>AtDJ2</i> y <i>AtDJ3</i>	
20	PCR de la segunda generación filial (F2) de la cruce de las líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes <i>At5g22060 (AtDJ2)</i> y <i>At3g44110 (AtDJ3)</i>	49
21	PCR del T-DNA de la segunda generación filial (F2) de las líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes <i>At5g22060 (AtDJ2)</i> y <i>At3g44110 (AtDJ3)</i>	50
22	Análisis del fenotipo de líneas mutantes sencillas (<i>atdj2</i> y <i>atdj3</i>) y la doble mutante (<i>atdj2-atdj3-46</i>) bajo condiciones de estrés salino	52
23	Amplificación del ORF <i>AtDJ2</i> en el vector pENTR223fi para la sobreexpresión en <i>A. thaliana</i>	53
24	Amplificación del ORF del gen <i>AtDJ2</i> en el vector pMDC32 en <i>E. coli</i>	53
25	PCR de colonia del gen <i>AtDJ2</i> en el vector pMDC32 en <i>A. tumefaciens</i>	54
26	Sistema de dos híbridos “split-ubiquitin” de <i>S. cerevisiae</i>	55
27	Amplificación del gen <i>AtDJ2</i> para el sistema de dos híbridos “split-ubiquitin” de <i>S. cerevisiae</i>	56
28	Digestión y ligación del gen <i>AtDJ2</i> en el vector pDHB1 para el sistema de dos híbridos “split-ubiquitin” de <i>S. cerevisiae</i>	57
29	Amplificación del gen <i>AtDJ2</i> en el vector pDHB1 en <i>E. coli</i> para el sistema de dos híbridos “split-ubiquitin” de <i>S. cerevisiae</i>	57
30	Digestión del plásmido pDHB1-AtDJ2-1 con la enzima <i>Sfi</i> I	58
31	Secuencias de cDNA y de proteína del gen <i>OpsHSP18</i> de <i>Opuntia streptacantha</i>	59
32	Árbol filogenético de las proteínas sHSP de <i>A. thaliana</i>	60
33	Alineamiento tipo Clustal W del dominio α -cristalino de la proteína <i>OpsHSP18</i> de <i>O. streptacantha</i> y la proteína	61

	At5g59720 de <i>A. thaliana</i>	
34	Patrón de expresión del gen At5g59720 de <i>A. thaliana</i>	61
35	Análisis de la expresión del gen <i>OpsHSP18</i> de <i>Opuntia streptacantha</i> bajo condiciones de estrés abiótico	62
36	Amplificación del ORF del gen <i>OpsHSP18</i> a partir de cDNA	63
37	Análisis del gen <i>OpsHSP18</i> en el vector pEntry en <i>E. coli</i>	64
38	PCR de colonia del ORF del gen <i>OpsHSP18</i> en el vector pMDC32 en <i>E. coli</i>	64
39	PCR de colonia del gen <i>OpsHSP18</i> en el vector pMDC32 en <i>A. tumefaciens</i>	65
40	PCR de las líneas transgénicas del gen <i>OpsHSP18</i> en <i>A. thaliana</i>	66
41	Expresión de las líneas transgénicas del gen <i>OpsHSP18</i> en <i>A. thaliana</i>	67
42	Análisis del fenotipo de las líneas sobreexpresantes del gen <i>OpsHSP18</i> de <i>A. thaliana</i> bajo condiciones de estrés abiótico	68

ABREVIATURAS

aa	Aminoácidos
ABA	Ácido abscísico
ABFs	Por sus siglas en inglés (ABRE binding factors)
ABRE	Elementos de respuesta ácido abscísico
ADP	Difosfato de adenosina, del inglés A denosine Di Phosphate
APX	Ascorbato peroxidasa
AQP	Acuaporinas, del inglés A Qua P orins
ATP	Trifosfato de adenosina, del inglés A denosine Tri Phosphate
CAT	Catalasa
CDPKs	Proteínas cinasas dependientes de calcio
Col-0	Ecotipo Columbia 0 de <i>Arabidopsis thaliana</i>
d	Días
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxiribonucleico, del inglés D eoxyribo N ucleic A cid
dNTP's	Trifosfatos Deoxinucleótidos del inglés d eoxy N ucleotide Tri Phosphates
DRE	Elementos de respuesta a la deshidratación, del inglés Elements of response to dehydration
EDTA	Ácido etiléndiaminotetraacético, sal disódica
F	Fenilalaninas
G	Glicinas
H	Horas
HSEs	Elementos de choque térmico
HSP	Proteínas de choque térmico
IPCC	Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático
Kb	Kilobases
kDa	Kilo Dalton
L	Lisomas
LB	Borde izquierdo, del inglés L eft B order

LR	Luz-Riego
LB	Medio Luria Bertani
MS	Medio Murashige y Skoog
MgCl₂	Cloruro de magnesio
Min	Minutos
mL	Militro
mM	Milimolar
NaCl	Cloruro de sodio
Ng	Nanogramo
°C	Grados centígrados
OD	Densidad óptica, del inglés O ptical D ensity
ORFs	Marco de lectura abierto del inglés O pen R eading F rame
P	Plastidios
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, del inglés P olymerase C hain R eaction
RB	Borde derecho, del inglés R ight B order
RE	Retículo endoplásmico
RNA	Ácido ribonucleico, del inglés R ibo N ucleic A cid
ROS	Especies reactivas de oxígeno, del inglés R eactive oxygen species
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción de la Cadena de Polimerasa en Transcripción Reversa, del inglés R everse T ranscription P olymerase C hain R eaction,
s	Segundos
SA	Ácido salicílico, del inglés S alicylic A cid
sHSP	Proteínas de choque térmico de bajo peso molecular
SOD	Superóxido dismutasa
SR	Sombra-Riego
SS	Sombra-Sequía
SSH	Hibridación sustractiva por supresión
TAE	Tris, Acetato y EDTA

UTR	Región no traducida, del inglés Un Translated R egion
mg	Microgramos
μL	Microlitros
μM	Micromolar

RESUMEN

“Caracterización molecular y funcional de genes que codifican proteínas de choque térmico de plantas bajo condiciones de estrés abiótico”

Actualmente las actividades antropogénicas tienen un gran impacto sobre el planeta, las cuales están provocando alteraciones en el clima y una contaminación ambiental importante. Lo anterior se debe principalmente al uso indiscriminado de combustibles fósiles, el uso de aerosoles, la deforestación masiva, entre otros, las cuales han intensificado considerablemente las emisiones de CO₂, causando el calentamiento global. Además, la escasez del agua dulce el cual es uno de los principales factores limitantes para la productividad agrícola, junto con la calidad de los suelos agrícolas que cada día son más pobres y están más contaminados debido al uso inadecuado y mal manejo de la agricultura tradicional.

Como resulta difícil que las plantas se adapten a todos los cambios que está sufriendo el planeta, es de suma importancia estudiar y comprender los mecanismos involucrados en la respuesta de las plantas al estrés abiótico. Por lo que el ampliar la información a nivel básico sobre los procesos moleculares generará nuevos conocimientos que serán claves para la obtención de plantas más tolerantes al estrés.

Uno de los principales mecanismos de tolerancia al estrés, es la síntesis de chaperonas moleculares, como son las proteínas de choque térmico (HSPs). Estas proteínas son esenciales para la síntesis, la protección, el transporte, el plegamiento o el replegamiento y la degradación de proteínas parcialmente o completamente desnaturalizadas bajo condiciones normales y en condiciones de estrés.

Nuestro grupo de investigación ha construido bibliotecas sustractivas (SSHs) como por ejemplo de frijol (*Phaseolus vulgaris*) bajo estrés salino, y bibliotecas de cDNA de nopal (*Opuntia streptacantha*) bajo diferentes condiciones de estrés

abiótico, en donde hemos identificado una serie de genes relacionados de la respuesta al estrés que son interesantes para su estudio. En dichas bibliotecas hemos seleccionado genes que codifican para chaperonas moleculares como las proteínas de choque térmico (HSP), para su caracterización funcional en *Arabidopsis thaliana*.

El propósito de este estudio fue caracterizar molecular y funcionalmente HSPs, tales como las proteínas DnaJ (HSP40) de *A. thaliana* y un gen de nopal (*O. streptacantha*) que codifica para una proteína de choque térmico de bajo peso molecular (sHSP), bajo condiciones de estrés abiótico.

Para la caracterización de los genes DnaJ de *A. thaliana*, el primer paso fue la genotipificación de las líneas insercionales de T-DNA de los genes At5g22060 (*AtDJ2*) y At3g44110 (*AtDJ3*) para obtener mutantes insercionales sencillas de cada gen. Dichas mutantes sencillas presentan un fenotipo de sensibilidad en germinación bajo condiciones de estrés salino. A partir de estos resultados, generamos una doble mutante (*atdj2-atdj3-46*), en la cual obtuvimos un fenotipo de mayor sensibilidad en cuanto a la velocidad de germinación bajo condiciones de estrés salino, comparándola con las líneas mutantes sencillas y el ecotipo parental (Col-0). También nos enfocamos en realizar experimentos de ganancia de función, mediante la obtención de una línea sobreexpresante de uno de los DnaJ (*AtDJ2*), del cual construimos el vector para dicha sobreexpresión en *A. thaliana*, y hasta el momento contamos con semillas transformadas para identificar líneas transgénicas resistentes al marcador de selección del vector, para posteriormente, caracterizar su fenotipo bajo condiciones de estrés. Para la caracterización de la DnaJ (*AtDJ2*) realizamos la construcción de un vector para el sistema de dos híbridos, que nos permitirá identificar posibles blancos de interacción o ligandos de esta proteína.

En lo que respecta a la caracterización del gen *OpsHSP18* de nopal que codifica para una sHSP de 18KDa, nos planteamos sobreexpresarlo en *A. thaliana* para

caracterizar las líneas transgénicas bajo condiciones de estrés. Dos líneas transgénicas (OpsHSP18-over3 y OpsHSP18-over7) se sometieron a estrés salino (150mM de NaCl) junto con plántulas del ecotipo parental Col-0 durante 15 días, en donde se observó un menor daño entre líneas que sobreexpresan la *OpsHSP18* de nopal con respecto a las plantas control. De manera interesante, al momento de realizar los experimentos de recuperación, los cuales consisten en pasar las plántulas a tierra sin la aplicación de estrés salino, se observó una mayor tolerancia de las líneas transgénicas, logrando hasta un 70% de supervivencia en comparación con un 20% en la parental Col-0.

Con base a los resultados obtenidos durante este estudio, podemos señalar que ambas chaperonas moleculares de la familia HSP están involucradas en la respuesta al estrés salino, sugiriendo que podrían estar participando en la protección de proteínas cuando la semilla o la plántula está sujeta a condiciones de salinidad.

Palabras claves: *Arabidopsis thaliana*, Estrés abiótico, HSPs, DnaJ y OpsHSP18.

ABSTRACT

Currently, anthropogenic activities have an important impact on the planet, causing climate changes and pollution of the environment. These changes are mainly by the indiscriminate use of fossil fuels and aerosols, massive deforestation, among others, which have intensified CO₂ emissions causing global warming. In addition, water deficiency, which is one of the major limiting factors of agricultural productivity; as well as the soil quality, which is continuously polluted and degraded by the inadequate management of conventional agriculture.

Since it is becoming difficult for plants to adapt to all changes taking place in the world, it is very important to study and understand the mechanisms involved in plant responses to abiotic stress. In this regard, improving the knowledge on the molecular events associated to stress tolerance, will allow the generation of plants even more tolerant to stress.

One of the main mechanisms of stress tolerance is the synthesis of molecular chaperones such as heat shock proteins (HSPs). These proteins are essential for the synthesis, protection, transport, folding or refolding, and degradation of partially or completely unfolded proteins under normal and stress conditions.

Our research group has constructed a subtractive library (SSHs) of common bean (*Phaseolus vulgaris*) under salt stress, and a cDNA library of Cactus pear (*Opuntia streptacantha*) under different abiotic stress conditions. From these libraries, we have identified a group of stress related genes that are attractive candidates for further studies. From these genes, we selected those encoding molecular chaperones such as HSPs for their functional characterization in *Arabidopsis thaliana*.

The aim of this study was the characterization of HSPs at the molecular and functional level, including two DnaJ proteins (HSP40) from *A. thaliana* and a gene

encoding a small heat shock protein from Cactus pear (*O. streptacantha*) under abiotic stress conditions.

In order to characterize the *DnaJ* genes from *A. thaliana*, two T-DNA insertional mutant lines At5g22060 (*AtDJ2*) and At3g44110 (*AtDJ3*) were genotyped. These single T-DNA insertional mutants showed a phenotype of sensitivity in germination under salt stress conditions. Based on these results, a double mutant (*atdj2-atdj3-46*) was generated, obtaining seeds with an increased sensitivity to salt stress during germination, in which a notable retardation in comparison to the parental ecotype (Col-0) was observed. On the other hand, gain of function experiments are in progress. Up to now, we constructed a binary vector for the over-expression of one of the *DnaJ* genes (*AtDJ2*) in *A. thaliana*, and we are analyzing the F1 generation. In addition, we generated a bait-vector for the split-ubiquitin yeast-two-hybrid system in order to identify possibly protein ligands of the *DnaJ* (*AtDJ2*) protein.

Finally, we started the characterization of a gene that encodes a Cactus pear sHSP (*OpsHSP18*) of 18KDa. We constructed a binary vector for the over-expression of this gene in *A. thaliana*. Two transgenic lines (*OpsHSP18-over3* and *OpsHSP18-over7*) that over-expressed the Cactus pear gene were subjected to salt stress (150 mM NaCl) during 15 days. These lines showed less damage in comparison to the parental ecotype Col-0 under this treatment. Interestingly, after the recovery experiments, in which the plants were grown without stress, the transgenic lines showed a higher rate of survival (70%) in comparison with the parental plants Col-0 (20%).

Based on the results obtained during this study, we concluded that both molecular chaperones of the HSP family are involved in the response to salt stress, suggesting they might have an important role in the protection of proteins when the plants are subject to salinity stress.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*, Abiotic stress, HSPs, *DnaJ*, and *OpsHSP18*.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Estrés en plantas

Las condiciones ambientales ejercen una gran influencia sobre la vida en la tierra y son parte de la vida diaria de todos los seres vivos del planeta, incluyendo a los humanos y por lo tanto, son esenciales para el bienestar y la salud, la producción de alimentos, entre otros. El Panel Intergubernamental sobre el Cambio Climático (IPCC, 1996) presentó evidencia científica de que las actividades humanas están influyendo en el clima.

Asimismo, las variaciones en el medio ambiente tienen un mayor impacto en la agricultura que por ejemplo, en la ganadería, ya que las especies vegetales tienen una mayor capacidad de adaptación, debido a que no presentan movilidad que les permita protegerse al ritmo estacional del clima o de los cambios que está sufriendo el planeta. Esto es una seria preocupación para la seguridad alimentaria mundial, aunado a diversos factores como el aumento en la demanda de alimentos para la población, la disminución de la productividad en las regiones de alta productividad, la contaminación del suelo, del agua y del medio ambiente, y el aumento en la vulnerabilidad en la agricultura como consecuencia del cambio climático (Khanna-Chopra y Sinha, 1998).

Debido a estas razones, las plantas están sometidas a una amplia variedad de condiciones ambientales que les pueden inducir estrés y tener un efecto negativo en su crecimiento y desarrollo. El estrés se define como una condición desfavorable que afecta el metabolismo y bloquea el crecimiento y el desarrollo de las plantas, alterando o interrumpiendo la homeostasis metabólica de la planta por un factor externo. El estrés abiótico limita el crecimiento y la productividad de las plantas, por lo tanto afectan el bienestar de la población humana (Suzuki y Mittler, 2006).

Las plantas siendo organismos sésiles, no pueden escapar de los factores de estrés abiótico, sin embargo, han desarrollado diferentes mecanismos que le permiten tolerar y responder rápidamente a múltiples cambios ambientales (Rao, 2006). Una red interconectada del sistema de respuesta al estrés celular es un pre-requisito para la supervivencia y productividad de la planta (Brunold *et al.*, 1996).

Las respuestas varían dependiendo del tipo y duración del estrés al que está sometida la planta, existen cambios anatómicos, fisiológicos y respuestas moleculares, las cuales llevan a la tolerancia o a la resistencia de la planta al estrés o bien en un caso extremo, en la cual los mecanismos que tiene la planta no le permiten responder eficientemente contra el estrés provocando un daño celular irreversible, que posteriormente ocasione la muerte. Las plantas varían en su tolerancia al estrés porque difieren en sus capacidades de percepción, de señalización y de respuesta al estrés (Wahid *et al.*, 2007).

1.1.1 Estrés abiótico

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

Algunas de las respuestas comunes al estrés abiótico a nivel molecular son la alteración de la expresión génica, la reducción de la actividad de enzimas vitales, una disminución de la síntesis de proteínas y una desorganización de los sistemas que tienen membrana. Algunos mecanismos de tolerancia al estrés abiótico es la activación de factores de señalización, la alteración en la expresión génica, la

acumulación de solutos compatibles, la síntesis de proteínas de estrés, la acumulación de poliaminas y un ajuste del balance hormonal, entre otros mecanismos (Rao, 2006).

Las plantas están expuestas a combinaciones de estrés al mismo tiempo o bien separados temporalmente y en ambos casos deben de presentar una respuesta integrada. Asimismo, las rutas del estrés abiótico muestran elementos en común que interactúan de una manera similar (“cross-talk”) y son potenciales para la respuesta al estrés (Knight y Knight, 2001).

Por lo tanto, la sequía, la salinidad, las temperaturas extremas y el estrés oxidativo están a menudo interconectados, y pueden inducir daños similares a la célula. Por ejemplo, la sequía o la salinidad, primero se manifiesta como estrés osmótico, dando como resultado una desorganización de la homeostasis y de la distribución iónica en la célula (Zhu, 2001). El estrés oxidativo, el cual frecuentemente acompaña al estrés por calor, por sequía o al estrés salino, puede causar la desnaturalización de las proteínas (Smirnov, 1998). Entonces, como consecuencia estos tipos de estreses ambientales, a menudo activan rutas similares rutas de señalización (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000; Knight y Knight, 2001) y respuestas celulares, tales como la producción de proteínas de estrés, regulación de las proteínas antioxidantes y acumulación de osmolitos compatibles (Vierling y Kimpel, 1992; Cushman and Bohnert, 2000).

1.1.2 Respuesta de la planta al estrés abiótico

La respuesta de la planta al estrés abiótico, involucra un conjunto de genes, mecanismos bioquímicos y moleculares (Fig. 1). Los tipos de estreses primarios son la sequía, la salinidad, el calor y el frío, causando daños celulares y a la vez provocan otros tipos de estrés secundarios tales como el estrés osmótico y el oxidativo.

Las primeras señales de estrés que se han sugerido son la desorganización de la homeostasis osmótica y iónica, en lo que respecta al estrés por sequía, salinidad y frío (Wang *et al.*, 2003) y los cambios en la fluidez de la membrana, el daño funcional y estructural de proteínas causado por temperaturas extremas (Wahid *et al.*, 2007). Por lo que estas señales desencadenan procesos de percepción y de transducción de estas señales, tales como la síntesis de osmosensores, segundos mensajeros (Ca^{2+} , ROS), MAP cinasas, sensores de Ca^{2+} (SOS3) y proteínas cinasas dependientes de calcio (CDPKs) (Wang *et al.*, 2003). El resultado de las cascadas de señalización, implican la modificación y el control de la expresión de factores de transcripción que activan un amplio conjunto de genes (Sung *et al.*, 2003) tales como, factores de transcripción por choque térmico (HSFs) que se unen a elementos regulatorios localizados en los promotores de los genes Hsp, referidos como elementos de choque térmico (HSEs; Schoffl *et al.*, 1998); factores DREB que activan la expresión de genes que contienen elementos DRE (elementos de respuesta a deshidratación), involucrados en la tolerancia de la planta al estrés por sequía, salinidad y frío (Liu *et al.*, 2000); factores de transcripción que se unen a elementos de respuesta ácido abscísico (ABRE), estos se denominan ABFs por sus siglas en inglés (ABRE binding factors; Choi *et al.*, 2000) (Fig. 1).

El control transcripcional activa mecanismos de respuesta para restablecer la homeostasis, proteger y reparar el daño de proteínas y de membranas (Wang *et al.*, 2003). Dichos mecanismos de respuesta incluyen la expresión de proteínas de detoxificación, tales como la superóxido dismutasa (SOD), la ascorbato peroxidasa (APX), la catalasa (CAT) entre otras (Mittler *et al.*, 2004) ya que cuando la planta está expuesta a condiciones desfavorables como a temperaturas extremas, sequía, o estrés por salinidad puede incrementar la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). Aunque estas ROS juegan un papel importante en señalización, elongación celular, entre otros, también pueden causar daño a proteínas, lípidos, DNA y otras importantes macromoléculas, afectando fatalmente el metabolismo de las plantas y limitando su crecimiento

(Sairam y Tyagi, 2004). Otra de las respuestas es la acumulación de osmoprotectores (osmolitos compatibles) como son azúcares, prolina, glicina-betaina, lo que se sugiere que estos osmolitos compatibles contribuyen a la tolerancia al estrés (Sairam y Tyagi, 2004). Aunado a lo anterior, también se ha reportado la expresión de las acuaporinas (AQP), las cuales son proteínas transmembranales, encargadas de transportar el agua a través de los compartimentos celulares, y por lo tanto, desempeñan un papel dinámico en el mantenimiento de la homeostasis celular (Fig. 1; Estrella *et al.*, 2004).

Otros dos grupos importantes de proteínas inducidas al estrés son las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEAs) y las proteínas de choque térmico (HSP). En el caso de las LEAs se ha sugerido que tienen una actividad tipo chaperona, y también, actúan como moléculas de unión a agua, en el secuestro de iones, en la estabilización de macromoléculas y de membranas (Thomashow, 1999). Las HSPs, participan en mantener la conformación funcional y estructural de las proteínas, y previniendo su agregación. Las HSPs actúan como chaperonas moleculares, las cuales son responsables de la síntesis, la maduración y la degradación de proteínas bajo condiciones normales, y bajo condiciones de estrés, participan en la protección de proteínas, en la estabilización de membranas y asistir en el plegamiento de proteínas (Fig. 1; Vierling, 1991; Waters *et al.*, 1996).

Una respuesta inadecuada en uno o varios pasos de las rutas de señalización o en la activación de genes puede resultar en cambios irreversibles en la homeostasis celular y en la destrucción funcional y estructural de proteínas y membranas, provocando la muerte celular (Wang *et al.*, 2003).

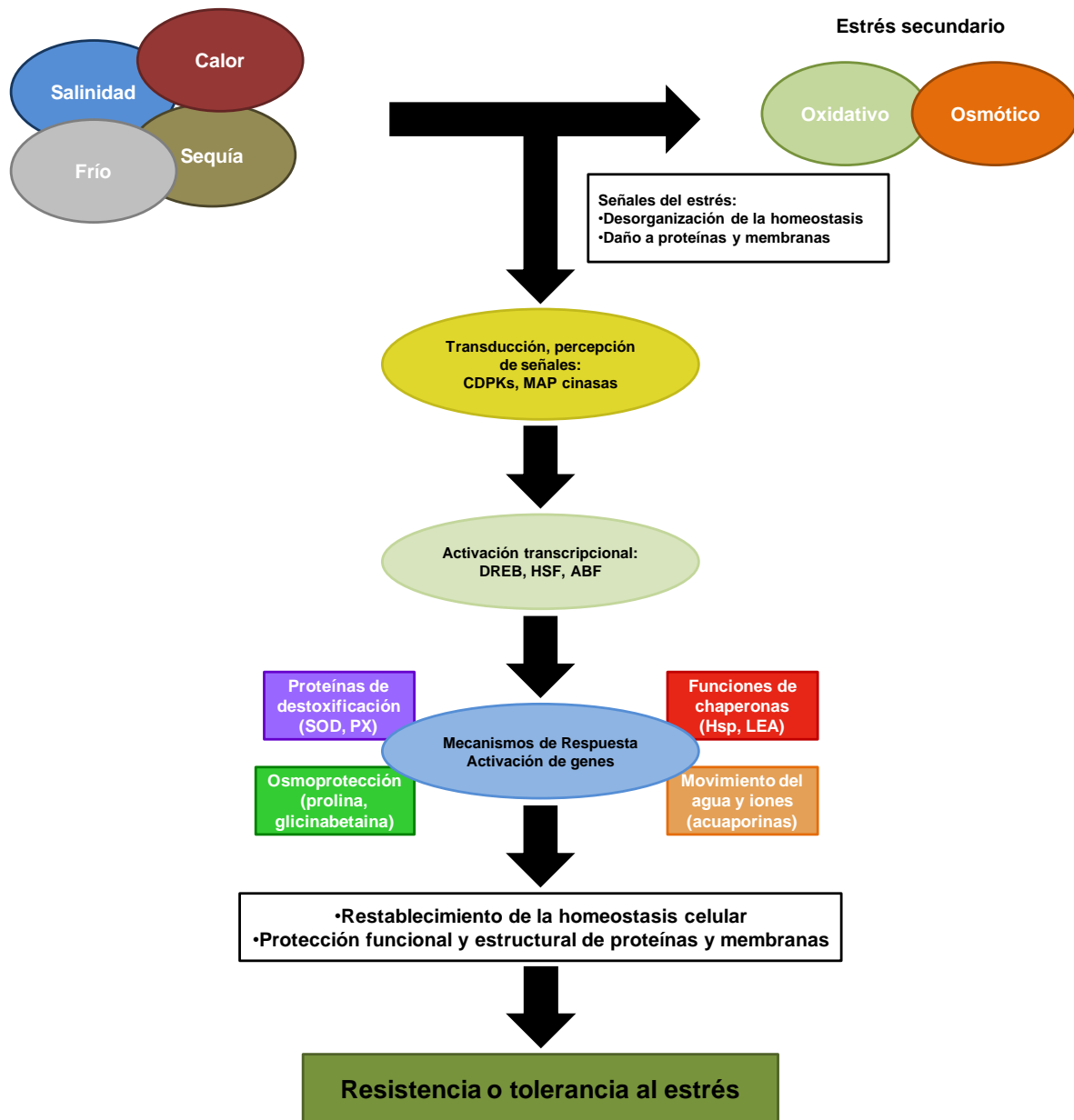


Figura 1. Respuesta de la planta al estrés abiótico. Los tipos de estrés primarios son: sequía, salinidad, calor y frío; a menudo están interconectados, causando un daño celular y dos tipos de estrés secundarios, tales como estrés oxidativo y osmótico. Las señales de estrés (ejemplo, efecto iónico y osmótico, o cambios en la fluidez de la membrana) que desencadenan procesos de señalización y el control transcripcional, los cuales activan los mecanismos de respuesta al estrés para restablecer la homeostasis y proteger y reparar el daño a proteínas y membranas. Una respuesta inadecuada en uno o más pasos de la señalización y activación de genes pueden causar cambios irreversibles en la homeostasis y destrucción funcional y estructural de proteínas, causando la muerte celular. Esta imagen se obtuvo de Sung *et al.* (2003).

1.2 Proteínas de choque térmico (HSPs)

A nivel molecular la respuesta al estrés por calor involucra la reprogramación de las actividades celulares por la síntesis de HSPs o chaperonas moleculares, las cuales se acumulan de manera dependiente de la dosis del estrés, para tener cantidades suficientes para la protección de la célula y proveer altos niveles de termotolerancia. La inducción de éstas proteínas se conserva en diversos organismos tales como bacterias, hongos, plantas y animales por el incremento de la temperatura (Hirt y Shinozaki, 2003).

Las HSPs comprenden varias familias de proteínas conservadas evolutivamente, las cuales han sido designadas de acuerdo a su peso molecular, como HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 y las sHSP (pequeñas) (Fig. 2; Buchner, 1996; Bukau y Horwich, 1998).

Principales familias de la HSP:

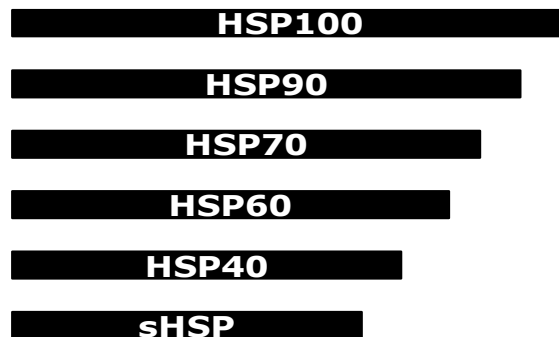


Figura 2. Principales familias de proteínas de choque térmico (HSP). Las proteínas de choque térmico son: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60, HSP40 y sHSP.

Las chaperonas moleculares son componentes claves para la homeostasis celular bajo condiciones óptimas y adversas, son responsables del plegamiento, el ensamble, el transporte y la degradación de proteínas en una amplia variedad de procesos celulares normales, al igual que bajo condiciones de estrés (Wang *et al.*, 2004). Las chaperonas moleculares están localizadas en el citoplasma y organelos tales como el núcleo, la mitocondria, el cloroplasto y el retículo endoplásmico (ER).

Se ha descrito que no solamente se expresan bajo condiciones de estrés a temperaturas altas sino que también responden a un amplio rango de estreses ambientales, tales como estrés hídrico, salino, osmótico, por frío y estrés oxidativo (Vierling, 1991; Boston, 1996).

1.2.1 Proteínas co-chaperonas HSP40 (DnaJ)

Las chaperonas moleculares mantienen la estructura nativa de otras proteínas. Las proteínas DnaJ pertenecen a la familia de las HSP40, también llamada proteínas de la familia J, las cuales regulan la actividad de las proteínas HSP70 (DnaK) permitiendo la unión a proteínas parcialmente o completamente desplegadas para ayudar a su correcto plegamiento o ensamble. También interactúan con las HSP60 (GrpE) las cuales son otras de las chaperonas moleculares (Walsh *et al.*, 2004).

En el genoma de *Arabidopsis thaliana* se predice que existen 89 proteínas que presentan el dominio J. La localización de estas proteínas se ha reportado en diversos organelos como en el retículo endoplásmico, vacuolas, lisosomas, peroxisomas, plastidios, aparato de Golgi, mitocondria, citoplasma y núcleo (Miernyk, 2001).

1.2.1.1 Estructura de las proteínas HSP40 (DnaJ)

La familia DnaJ de las chaperonas moleculares presenta en la región N-terminal, el dominio J característico conformado de aproximadamente 75 aminoácidos conservados, los cuales forman una estructura secundaria de 4 α -hélices y una región de loop entre las hélices II y III. La región entre las hélices contiene un tri péptido histidina - prolina- ácido aspártico (HPD) altamente conservado, el cual es esencial para la interacción con las proteínas HSP70 (DnaK). La función del dominio J consiste en el acoplamiento con las proteínas DnaK y la subsiguiente estimulación de la actividad ATPasa de la DnaK (Li *et al.*, 2007). Además del

dominio J, las proteínas DnaJ incluyen otras regiones bien definidas, como la región rica en glicinas y fenilalaninas (G/F), adyacente al dominio J; seguido por una región rica en cisteína la cual forma un dominio dedo de zinc, que contiene cuatro motivos repetidos (CXXCXGXG). Por último, una región C-terminal pobremente conservada y de tamaño variable (Yan y Craig, 1999). El dominio J y la región rica en G/F, son importantes para la interacción con la proteína DnaK, mientras que el dominio dedo de zinc y la región C-terminal, están involucrados en la interacción y en la unión al sustrato (Fig. 3) (Bukau y Horwich, 1998).

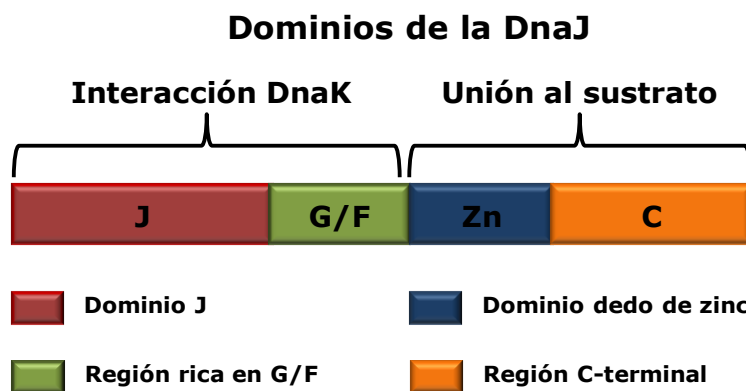


Figura 3. Estructura de las proteínas HSP40 (DnaJ). Los dominios están representados por cajas de colores: dominio J y la región rica en glicinas y fenilalanina (G/F) interactúan con las proteínas DnaK o HSP70 (cajas de color rojo y verdes respectivamente), el dominio dedo de zinc y la región carboxi-terminal (C-terminal) intervienen en la unión al sustrato (cajas de color azul y naranja respectivamente).

1.2.1.2 Clasificación de las proteínas HSP40 (DnaJ)

La clasificación de estas proteínas, se basa en la presencia de los dominios conservados, el primer grupo denominado tipo I o A, presenta todos los dominios: el dominio J, seguido de la región rica en glicinas y fenilalanina (G/F), después por el dominio rico en cisteínas (dedo de zinc) y por último la región C-terminal. En lo que respecta al grupo tipo II o C, este carece solamente del dominio dedo de zinc, y el grupo tipo III o C, estos carecen tanto de la región rica en glicinas y fenilalanina (G/F), como la del dominio dedo de zinc (Fig. 4; Yan y Craig, 1999).

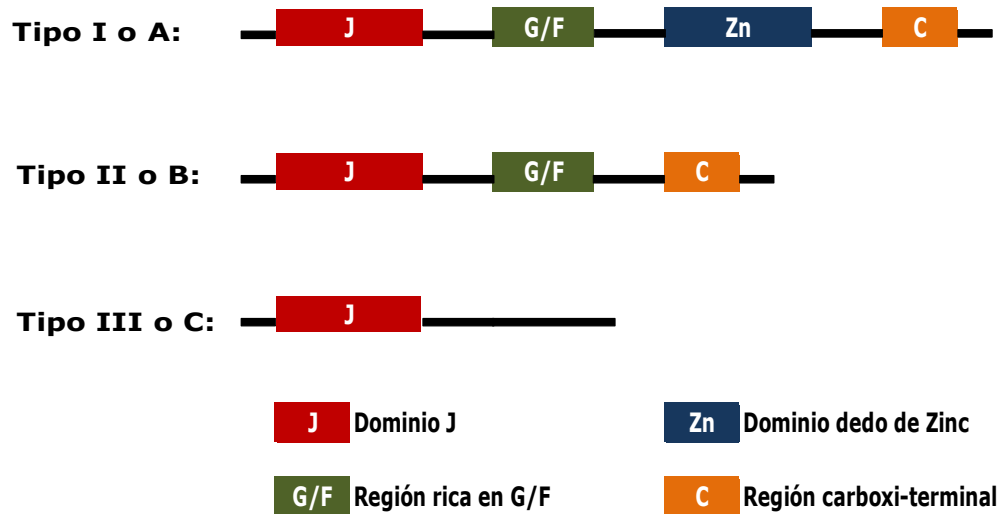


Figura 4. Clasificación de las proteínas HSP40 (DnaJ). Las proteínas DnaJ se clasifican en Tipo I o A presentan el dominio J, región rica en glicinas y fenilalanina (G/F), el dominio dedo de zinc y la región C-terminal. El tipo II o B incluyen los dominios mencionados anteriormente excepto el dominio dedo de zinc y por último el tipo III o C solamente presentan el dominio J.

1.2.1.3 Mecanismo de regulación de las proteínas HSP70 (DnaK) por las co-chaperonas HSP40 (DnaJ) y HSP60 (GrpE)

Las proteínas HSP70 (DnaK) son altamente versátiles ya que pueden asistir a una gran variedad de procesos de plegamiento de proteínas previniendo su agregación. El plegamiento de proteínas mediada por las HSP70 es dependiente de co-chaperonas como las DnaJs estimulando la hidrólisis de ATP; proceso en el cual también participa el factor de cambio de nucleótido o proteína HSP60 (GrpE) (Nollen y Morimoto, 2002).

El ciclo empieza con la asociación del sustrato con la proteína DnaJ, aunque en algunos casos el ciclo puede empezar con la asociación del sustrato con la DnaK-ATP. Posteriormente, la DnaK-ATP acepta el sustrato que le transfiere el complejo DnaJ-sustrato. Este proceso ocurre en dos etapas, en la primera la DnaK-ATP interacciona con el dominio J de la DnaJ a través de un sitio indeterminado del dominio ATPasa de la DnaK, y en la segunda, ocurre la transferencia del sustrato desde la DnaJ a la cavidad abierta de unión de la DnaK. Ambos pasos son

requeridos para estimular la hidrólisis del ATP de la DnaK, resultando en la estabilización del complejo DnaK-sustrato; además, éste proceso de hidrólisis se encuentra estrechamente acoplado a la unión del sustrato por la DnaK. En la transferencia del sustrato a la DnaK y la conversión de la DnaK-ATP al estado DnaK-ADP, la afinidad del complejo DnaK-sustrato por la proteína DnaJ se reduce, provocando la disociación de la DnaJ. Después, la GrpE se une al complejo DnaK-ADP-sustrato, resultando en la liberación de ADP, y consecuentemente, en la rápida unión de ATP a DnaK, la cual se liberará del sustrato unido, retornando a su estado inicial (Fig. 5; Bukau y Horwich 1998).

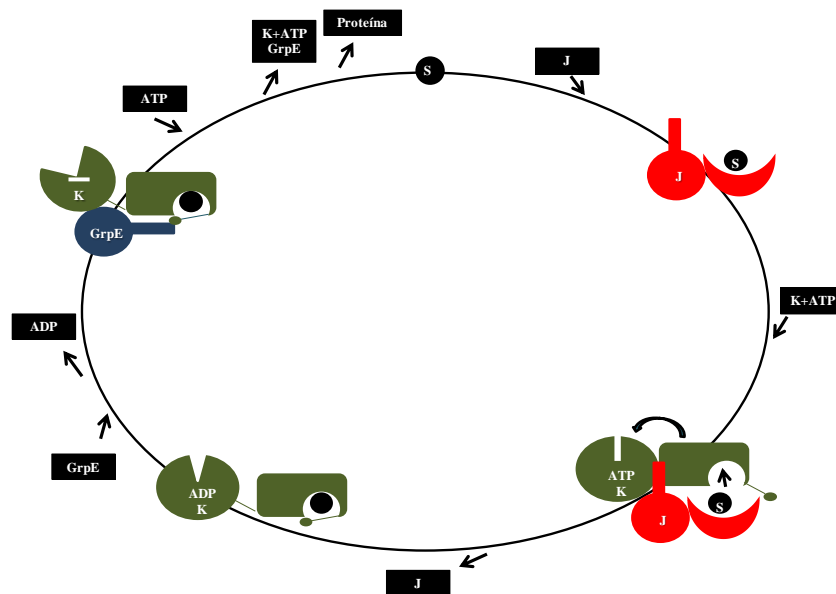


Figura 5. Mecanismo de regulación de las proteínas HSP70 (DnaK) por las co-chaperonas HSP40 (DnaJ) y HSP60 (GrpE). Las proteínas que participan en el modelo del ciclo son la DnaK, DnaJ, GrpE y las proteínas parcialmente desplegadas (S).

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

La función de las chaperonas moleculares como se mencionó anteriormente es interactuar y estabilizar otras proteínas que están parcialmente o totalmente desplegadas, como es el caso de proteínas que están en proceso de síntesis, en el transporte a través de la membrana o por los daños causados bajo condiciones de estrés celular. Muchas de las chaperonas se expresan en altos niveles durante

el estrés y son miembros de la familia de las proteínas de choque térmico (HSP), como las HSP90, HSP70 y sHSP (bajo peso molecular), aunque la proporción de estas tres clases difieren entre las especies de plantas. Bajo estas condiciones, se ha observado que los RNAm de las HSP70 y HSP90 pueden incrementar alrededor de 10 veces, mientras que las sHSP pueden incrementar hasta 200 veces (Wahid *et al.*, 2007).

Las sHSP forman una familia de proteínas divergentes estructuralmente, que se encuentran presentes en Archae, Bacteria y Eucaria (Caspers *et al.*, 1995). La masa molecular monomérica de las sHSP está entre los rangos de 12 a 42 kDa, pero en su estado nativo la mayoría forman oligómeros aproximadamente de 12 a 32 subunidades (Vierling *et al.*, 2009). Las sHSP están definidas por un dominio α -cristalino de aproximadamente 100 aminoácidos, éste dominio contiene una región consenso característica (AxxxnGvL), y se encuentra conservado en todas las sHSP de plantas (Waters, 1996; Scharf *et al.*, 2001). La función que se ha sugerido para este dominio α -cristalino es la interacción con las proteínas desplegadas. Dicho dominio está flanqueado por un dominio N-terminal, altamente variable en tamaño y en secuencia. Por la variabilidad en secuencia de esta región N-terminal se ha sugerido como candidato para la unión al sustrato y en el caso de la región C-terminal, que es corta, se ha propuesto como el sitio de contacto que estabilizan la estructura oligomérica (Fig. 6; Vierling, *et al.*, 2009).



Figura 6. Dominios de las proteínas sHSP. Los dominios presentes en las proteínas sHSP son: el dominio α -cristalino, la región N-terminal y la región C-terminal.

En el genoma de *A. thaliana*, se han identificado por lo menos 19 marcos de lectura abierto (ORFs) las cuales codifican para dichas proteínas. En plantas éstas proteínas se agrupan en 6 clases de sHSP, en base a su localización intracelular, como por ejemplo, en los compartimentos núcleo-citoplasma (clase CI, CII y CIII), en plastidios (clase P), en el retículo endoplásmico (clase ER), en la mitocondria

(clase M) y relacionadas a la clase CI. Esta clasificación se basa en las regiones N-terminal y C-terminal las cuales son variables y contienen secuencias señal que dirigen su localización intracelular (Scharf *et al.*, 2001).

1.2.2.1 Oligomerización de las proteínas sHSP

Un rasgo común de las sHSP es la formación de complejos oligoméricos grandes (Leroux *et al.*, 1997), siendo un prerrequisito estructural importante para la actividad de las sHSP. El modelo más caracterizado es la estructura de la sHSP de *Mycobacterium tuberculosis* de 150 kDa formados por trímeros de la HSP16.3 (Fig. 7; Chang *et al.*, 1996). En plantas el ensamble de las sHSP es mediante complejos de 200 a 300 kDa (Waters *et al.*, 1996) y el tamaño de los complejos en levaduras y en mamíferos está entre 400 a 800 kDa (Carver *et al.*, 1995).

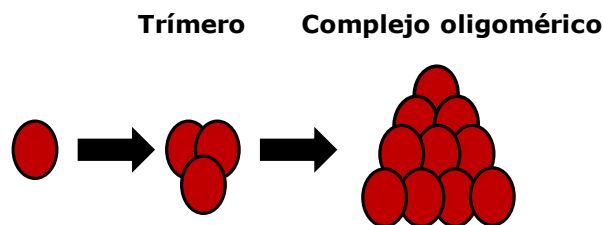


Figura 7. Complejo de oligomerización de las proteínas sHSP. El ensamble de las proteínas sHSP 16.3 de *Mycobacterium tuberculosis*, hasta formar complejos de oligoméricos.

Los oligómeros de sHSP pueden contener subunidades idénticas o mixtas, ya que diferentes sHSP están presentes en la misma célula o en los compartimentos celulares (Narberhaus, 2002). La hetero-oligomerización es un fenómeno común en células de mamíferos, y la formación de complejos mezclados en plantas y en bacterias parece ser menos frecuentes que en mamíferos, ya que las múltiples sHSP de las plantas se encuentran localizadas en diferentes compartimentos y es difícil que interactúen entre ellas (Waters, 1996).

1.2.2.1 Mecanismo de acción de las chaperonas sHSP

Las sHSP actúan también como chaperonas moleculares que interactúan con proteínas y previenen su agregación (Ehrnsperger *et al.*, 1999; Haslbeck *et al.*, 1999). El reconocimiento y unión a las estructuras parcialmente desplegadas es mediante la exposición de regiones hidrofóbicas, características de los intermediarios desplegados, por lo que la hidrofobicidad es un parámetro importante para la interacción sustrato-chaperona (Yeh *et al.*, 1994).

El mecanismo de acción de las sHSP es mediante la unión a intermediarios desnaturalizados para su protección, y así prevenir su agregación para mantenerlas en un estado competente de replegamiento. Dichas proteínas son capturadas para entrar en el proceso de replegamiento por otras chaperonas moleculares (Lee y Vierling, 2000). En contraste a las HSP70, las actividades de las sHSPs son independientes del ATP (Lee *et al.*, 1995). Como se muestra en la figura 8B, las proteínas nativas (N), cuando se encuentran bajo condiciones de estrés (temperaturas extremas, estrés oxidativo, salinidad, entre otros), sufren desplegamiento, o forman intermediarios parcialmente desplegados (I_1 y I_2), los cuales pueden entrar a dos rutas, la primera sin plegamiento (off-folding) y la segunda, de desplegamiento/plegamiento (unfolding/folding). La ruta sin plegamiento, sucede cuando las proteínas exponen sus regiones hidrofóbicas, al grado que fomentan su agregación y posiblemente su precipitación, si el daño es severo, en este caso es irreversible y lento (Fig. 8B). La otra ruta, de desplegamiento/plegamiento, permite contrarrestar el desplegamiento de los intermediarios desplegados (I_2), mediante la producción de chaperonas moleculares, tales como las sHSP, HSP70, entre otras, las cuales reconocen regiones hidrofóbicas de las proteínas desestabilizadas para prevenir su agregación. Las sHSP se encuentran formando agregados de chaperonas, los cuales son la forma inactiva, pero cuando se producen los intermediarios desplegados (I_2), estos agregados de sHSP se disocian posiblemente en dímeros (forma activa) para interactuar con I_2 , que posteriormente se asociaran a otros

dímeros hasta formar complejos chaperona-I₂, y así prevenir la agregación. Posteriormente, estos pueden ser plegados mediante la maquinaria de chaperonas HSP70-ATP, y tener como producto final la proteína plegada o en su forma nativa (N), en este caso la ruta es reversible y rápida (Fig. 8A; Carver *et al.*, 2003).

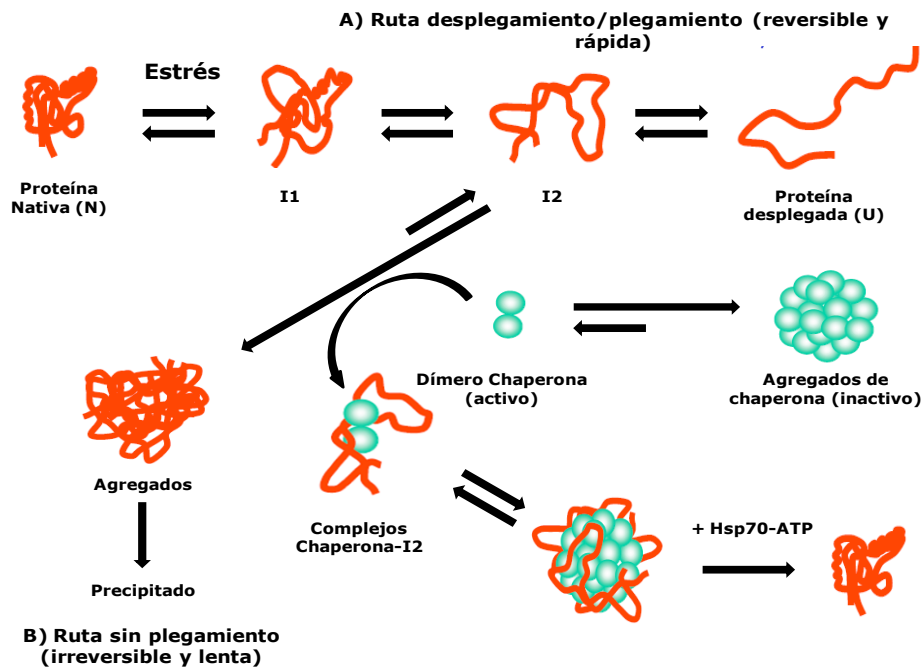


Figura 8. Mecanismo de acción de las proteínas sHSP. Existen dos rutas de las proteínas parcialmente desplegadas (U), A) Ruta de desplegado/plegamiento (reversible y rápida), en la cual intervienen los complejos de las proteínas sHSP con la maquinaria HSP70 (ATP), previniendo el desplegamiento irreversible de las proteínas y B) Ruta sin plegamiento (irreversible y lenta), causando el precipitado de las proteínas causado por las condiciones de estrés.

1.2.2.3 Expresión de las sHSP bajo condiciones de estrés abiótico

La expresión de estas proteínas se inducen bajo condiciones de estrés salino (Harrington y Alm, 1998), daño por congelamiento (Sebehat *et al.*, 1996), daño por estrés oxidativo (Banzet *et al.*, 1998), entre otros. En líneas mutantes de *A. thaliana*, la reducción de la expresión de la proteína At-HSP17.4 presenta un fenotipo de intolerancia a la desecación de la semilla, lo cual sugiere la protección de los componentes celulares por dichas chaperonas moleculares en condiciones

de estrés (Wehmeyer y Vieling, 2000). La sobreexpresión de la proteína sHSP17.7 muestra tolerancia a sequía (Sato y Yokoya, 2008). Por lo tanto, las sHSP tienen un papel importante en la adaptación de la planta en condiciones de estrés abiótico.

1.3 *Arabidopsis thaliana*

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

A. thaliana es una planta dicotiledónea pequeña que pertenece a la familia de *Brassicaceae*. Se considera un modelo de estudio ya que presenta muchas ventajas, que su ciclo de vida es corto, alrededor de 5 a 6 semanas, produce un gran número de semillas que permanecen viables durante varios años, crece en espacios limitados, es fácilmente manipulable para la polinización dirigida. Otra de las ventajas, es que cuenta con uno de los genomas más pequeños del reino vegetal, que codifica alrededor de 29,950 genes distribuidos en 5 cromosomas, es un organismo diploide (2n). Para el estudio de la biología molecular, *A. thaliana* es genéticamente manipulada a través de la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*. Los protocolos de transformación son sencillos y permiten generar plantas transgénicas al introducir genes exógenos provenientes de otras especies de plantas o bien genes endógenos de la misma planta. Además, actualmente se cuenta con una gran variedad de líneas insercionales de T-DNA con pérdida de función lo cual permite estudiar funcionalmente genes de interés.

Planteamiento y Justificación

Nuestro grupo de investigación ha construido diversas bibliotecas de cDNA y sustractivas (SSHs) tanto en nopal como en frijol bajo estrés abiótico, en donde hemos identificado una serie de genes que son interesantes para su caracterización funcional, los cuales están implicados en respuesta bajo condiciones de estrés.

En el caso de la SSH de frijol (*Phaseolus vulgaris*), en donde utilizamos la variedad "Pinto Villa" la cual es tolerante a sequia y salinidad, se extrajo RNA de hojas de plantas sometidas a 200mM de NaCl por 2 y 5 d crecidas en un sistema semi-hidropónico para ser sustraído con RNAs de plantas control crecidas sin sal a los 2 y 5 d. A partir de los 71 unigenes obtenidos en esa SSH, seleccionamos una chaperona molecular, la cual es una proteína DnaJ que pertenece a la familia de las proteínas de choque térmico con un peso de 40KDa (HSP40). Por consiguiente, como en frijol solo contábamos con una secuencia parcial del cDNA de dicho gen, nos planteamos el objetivo de estudiar y caracterizar los genes ortólogos de Arabidopsis, los genes At5g22060 y At3g44110 que codifican para las DnaJ.

En relación a la biblioteca de cDNA de nopal (*Opuntia streptacantha*) se obtuvo a partir de una mezcla de RNAs aislados de cladodios de plantas tratadas con diversas condiciones de estrés abiótico. Nuevamente, seleccionamos de esta biblioteca una proteína de choque térmico de bajo peso molecular (OpsHSP18) la cual obtuvimos el cDNA completo para su caracterización molecular y funcional.

Consideramos que estas proteínas de la familia de las HSP son componentes importantes de los mecanismos de respuesta a estrés en plantas. Las plantas inmediatamente después de la exposición al estrés y la subsecuente percepción de la señal, activa mecanismos moleculares que alteran la expresión de genes y la acumulación de transcritos, para dar lugar a la síntesis de proteínas relacionadas

al estrés como una estrategia de tolerancia, por lo que la función de las HSPs es fundamental en el procesamiento, la protección, el transporte y la degradación de proteínas como estrategia post-traducciona.

Estrategia de trabajo

En este trabajo utilizamos como modelo a *A. thaliana*, ya que es el modelo más avanzado para el estudio de la biología molecular vegetal, debido a que cuenta con una amplia variedad de herramientas para la caracterización de genes de interés como: líneas mutantes insercionales de T-DNA (pérdida de función), bases de datos de microarreglos bajo diversas condiciones de estrés, sistema de transformación genética eficiente, entre otros.

Como estrategia primero utilizamos las bases de datos de microarreglos que existen para *Arabidopsis* para realizar un análisis bioinformático que nos permitiera determinar si estos transcritos se inducen bajo condiciones de estrés abiótico. Cabe mencionar que al comenzar este proyecto no existían datos publicados de estos genes en particular en la literatura.

Posteriormente, nuestra siguiente estrategia fue analizar las mutantes sencillas bajo diversos tipos de estrés abiótico para determinar si presentaban algún fenotipo de sensibilidad bajo dichas condiciones de estrés. Además debido a que los genes *AtDJ2* y *AtDJ3* de *Arabidopsis* son parálogos con un 90.8% de identidad, nos planteamos generar una mutante doble, para lograr un fenotipo de mayor sensibilidad al estrés. Otro punto importante que nos propusimos fue la construcción de los vectores, tanto para la sobreexpresión (ganancia de función) de estos genes como para desarrollar los experimentos de dos híbridos en *S. cerevisiae*., lo cual será clave identificar blancos que interactúen con dichas proteínas para poder comprender los mecanismos y la forma de trabajar de estas chaperonas.

Por último, respecto a la caracterización del gen *OpsHSP18* de nopal, primero nos propusimos realizar análisis de expresión a nivel transcripcional de plantas de nopal sometidas a estrés abiótico (las cuales contábamos con el cDNA de nuestro laboratorio) para determinar si este transcrito se induce bajo agobios abióticos. Después construimos un vector para sobreexpresar el gen *OpsHSP18* de nopal en *Arabidopsis* y poder analizar su fenotipo retando a estas líneas bajo diversas condiciones de estrés abiótico.

II. OBJETIVO

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

Caracterizar molecular y funcionalmente genes que codifican proteínas de choque térmico de plantas bajo condiciones de estrés abiótico.

En tanto que para lograr lo anterior, los **objetivos específicos** planteados fueron los siguientes:

1. Realizar análisis *in silico* de los genes At5g22060 y At3g44110 (DnaJ) y del gen *OpsHSP18*.
2. Genotipificar líneas mutantes insercionales de T-DNA de los At5g22060 (*AtDJ2*) y At3g44110 (*AtDJ3*) de *A. thaliana*.
3. Determinar el fenotipo de las mutantes sencillas en los genes *AtDJ2* y *AtDJ3* bajo condiciones de estrés abiótico.
4. Generar una doble mutante de los dos genes DnaJ (*atdj2* y *atdj3*) de *A. thaliana*.
5. Determinar el fenotipo de la doble mutante bajo condiciones de estrés abiótico.
6. Construir un vector para sobreexpresar el gen At5g22060 (*AtDJ2*) en *A. thaliana*.
7. Construir el vector anzuelo “bait” que contenga el ORF del gen At5g22060 (*AtDJ2*) para utilizarlo para el sistema de dos híbridos.
8. Analizar transcripcionalmente el gen *OpsHSP18* en plantas de nopal sometidas a condiciones de estrés abiótico.

9. Construir un vector para sobreexpresar el gen *OpsHSP18* de nopal en *A. thaliana*.
10. Determinar el fenotipo de la sobreexpresante del gen *OpsHSP18* de nopal en *A. thaliana* bajo condiciones de estrés abiótico.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales biológicos

3.1.1 *Arabidopsis thaliana*

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

Las líneas mutantes Salk que presentan inserción de T-DNA de *A. thaliana* que se estudiaron y las que se generaron en el laboratorio para la ganancia o pérdida de función, se describen en la tabla 1.

Tabla 1. Lista de semillas.

Líneas	Gen	Clave	Parental HM/HT	Origen	Características
1	Col-0	Ecotipo Columbia	WT	Dr. Gúzman	Ecotipo silvestre
DnaJs					
2	At5g22060	Salk_071563	HM	SALK	Inserción del T-DNA, ubicada en el 1er intrón del gen At5g22060
3	At3g44110	Salk_132923	HM	SALK	Inserción del T-DNA, ubicada en el cuarto exón del gen At3g44110
4	At5g22060/ At3g44110	Salk_071563/ Salk_132923	HT-HT	SSM	Doble mutante, primera generación filial (F1), son HT/HT
5	At5g22060/ At3g44110	Salk_071563/ Salk_132923	HM-HM y HT/HT	SSM	Doble mutante, segunda generación filial (F2), son

				HM/HM Y HT/HT
	OpsHSP18			
6	Sobreexpresante <i>OpsHSP18</i>	<i>OpsHSP18</i> (líneas transformantes de la 1-11)	SSM	Sobreexpresante del gen <i>OpsHSP18</i> , primera generación filial (F1)
7	Sobreexpresante <i>OpsHSP18</i>	<i>OpsHSP18</i> (líneas transformantes de la 1, 3, 6 y 7)	SSM	Sobreexpresante del gen <i>OpsHSP18</i> , segunda generación filial (F2)

SSM, Silvia Salas Muñoz

SALK, Signal Institute Genomic Analysis Laboratory

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

3.1.2 Microorganismos

En el presente estudio los microorganismos utilizados fueron cepas bacterianas comúnmente empleadas para la transformación y amplificación de DNA recombinante, como cepas empleadas para la transformación genética de plantas (tabla 2).

Tabla 2. Lista de Microorganismos.

Microorganismo	Cepa	Temperatura	Crecimiento	Procedencia
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV2260	28°C	48-72 h	Dr. Gúzman
<i>Escherichia coli</i>	TOP10	35°C	12-16 h	Invitrogen (2004b)

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

3.2 Vectores

En este estudio se utilizaron diversos vectores los cuales se muestran en la tabla 3. Entre ellos, los vectores de entrada como el pCR[®]8/GW/TOPO[®], que combina las tecnologías TOPO[®] Cloning TA y Gateway[®] (Invitrogen, 2004b) y está adaptado para permitir una fácil transferencia basada en la recombinación del producto de PCR de interés hacia los vectores destino Gateway[®]. Los vectores

destino como el pMDC32 se utilizan para la expresión de genes de interés en diferentes organismos experimentales. Dichos genes son transferidos al vector destino mediante un proceso de recombinación homóloga por el reconocimiento de sitios específicos entre el vector de entrada y el destino empleando la enzima clonasa LR (Invitrogen, 2004a).

Tabla 3. Lista de Vectores.

Vector	Características	Proveedor
pCR [®] 8/GW/TOPO [®]	<ul style="list-style-type: none"> • Vector de clonación • Autoreplicativo • Origen de replicación para <i>E. coli</i> • Tamaño de 2,817 pb • Resistencia a espectinomicina 	Invitrogen (2006)
pMDC32	<ul style="list-style-type: none"> • Vector del sistema Gateway • Vector de sobreexpresión • Autoreplicativo • Origen de replicación para <i>E. coli</i> y <i>A. tumefaciens</i> • Tamaño de 11,752 pb • Resistencia a kanamicina 	Invitrogen
pDHB1 (vector bait)	<ul style="list-style-type: none"> • Vector para el sistema de dos híbridos • Autoreplicativo • Origen de replicación para <i>E. coli</i> y <i>S. cerevisiae</i> • Tamaño de 8,961 pb • Resistencia a kanamicina 	DUALhunter kit user manual (2007)
pENTR223fi	<ul style="list-style-type: none"> • Plásmido G83687 • Autoreplicativo • Tamaño de 4,045 pb (vector+At5g22060) • Resistencia a espectinomicina 	Signal (2010)

A continuación se describen los vectores utilizados en este estudio:

1. **pCR[®]8/GW/TOPO[®] (pEntry) y pENTR223fi:** La tecnología de estos vectores, es facilitar la clonación de los productos de PCR en un solo paso

dentro del vector con una eficiencia del $\geq 95\%$. Una de las características de la tecnología TOPO Cloning TA, es proporcionar el vector abierto bordeado por residuos de timinas para la clonación del producto de PCR que tienen un residuo de adenina en cada extremo. Además, contienen el origen de replicación pUC que permite obtener un alto número de copias del plásmido en *E. coli*. Las clonas pueden ser fácilmente secuenciados ya que contiene sitios de unión a oligonucleótidos específicos localizados flanqueando el producto de clonación. Por otro lado, contienen los sitios attL1 y attL2 derivados del bacteriófago λ para recombinación del producto clonado hacia algún vector destino Gateway® (Invitrogen 2004b).

2. **pMDC32:** Es un vector destino que cuenta con la tecnología Gateway® y permite la recombinación homóloga de productos de interés desde un vector de entrada al poseer los sitios attR1 y attR2 mediante la enzima clonasa LR (Invitrogen). Se caracteriza por ser un vector binario que permite la expresión de genes en plantas. Cuenta con el promotor 35S del virus del mosaico de coliflor, el cual es un promotor fuerte y constitutivo, lo que permite la expresión del gen de interés en todos los tejidos de la planta. Además, posee las secuencias del borde derecho (BD) y el borde izquierdo (LB) del T-DNA de *A. tumefaciens* que se encuentran flanqueando al inserto, lo que permite la integración del DNA de interés al genoma de la planta (Curtis and Grossniklaus, 2003). Contiene el gen de resistencia a higromicina, lo que permite la selección de las plantas transgénicas.
3. **pDHB1:** Este vector de *Saccharomyces cerevisiae*, se utiliza para el sistema de dos híbridos con la tecnología “split-ubiquitin”, fue diseñado para ensayos de escrutinio para identificar y caracterizar las interacciones proteína-proteína, entre proteínas asociadas a la membrana ó proteínas citosólicas. El sistema está basado en fusionar el gen o dominio de interés (“bait”, anzuelo) con la mitad de la región C-terminal de la ubiquitina (Cub) y al factor de transcripción LexA-VP16. Este vector se caracteriza por tener sitios *Sfi*I que

son poco frecuentes en los genomas de eucariotes y en procariotes, por lo tanto, esto facilita la clonación direccional el gen de interés para la construcción del vector “bait” (Manual del kit DUALhunter; Biotech Dualsystems, 2007).

Las construcciones obtenidas en este estudio a partir de los vectores mencionados anteriormente, se describen en la tabla 4.

Tabla 4. Lista de construcciones.

Gen clonado	Vector	Cepa	Resistencia	Tamaño de inserto (pb)	Característica
At5g22060	pCR [®] 8/GW/TOPO	<i>E. coli Top-10</i>	espectinomicina	1260	Marco de lectura abierta (ORF) en sentido para la sobreexpresión de la DnaJ (<i>AtDJJ2</i>)
	pMDC32	<i>E. coli Top-10</i>	kanamicina	1260	Marco de lectura abierta (ORF) en sentido para la sobreexpresión de la DnaJ (<i>AtDJ2</i>)
	pMDC32	<i>A. tumefaciens</i> GV2260	kanamicina, rifampicina, ampicilina	1260	Marco de lectura abierta (ORF) en sentido para la sobreexpresión de la DnaJ (<i>AtDJ2</i>)
	pDHB1	<i>E. coli Top-10</i>	kanamicina	1260	Marco de lectura abierta (ORF) en sentido para el sistema de dos híbridos de la DnaJ (<i>AtDJ2</i>)
OpsHSP18	pCR [®] 8/GW/TOPO	<i>E. coli Top-10</i>	espectinomicina	492	Marco de lectura abierta (ORF) en sentido para la sobreexpresión de la <i>OpsHSP18</i>
	pMDC32	<i>E. coli Top-10</i>	kanamicina	492	Marco de lectura abierta (ORF) en sentido para la sobreexpresión de la <i>OpsHSP18</i>

pMDC32	<i>A. tumefaciens</i> GV2260	kanamicina, rifampicina, ampicilina	492	Marco de lectura abierta (ORF) en sentido para la sobreexpresión de la <i>OpsHSP18</i>
--------	---------------------------------	---	-----	--

3.3 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo se diseñaron para la amplificación específica de productos de PCR de interés empleando el programa Editseq (DNASTAR versión 7.0; 2006), los criterios que se tomaron en cuenta para el diseño de los oligonucleótidos enlistados en la tabla 5 son: temperatura de alineamiento similar entre cada pareja de oligonucleótidos ($\pm 2^\circ\text{C}$) y la ausencia de formación de estructura secundaria entre ellos.

Tabla 5. Lista de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de genes.

Gen	Nombre	Secuencia	Tm °C	Tamaño del amplicón (pb)
At5g22060				
A) Línea inercial	LP'071563	5' GGATTCTGATTGATAAAAGAAAACC 3'	59.68	986
	RP'071563	5' TCACGCTTCTCAGGATCACTTAAA 3'	61.15	
B) RT-PCR	LP'22060	5' CAACATGCGCATCTTAGTGATCT 3'	60.99	136
	RP'22060	5' GGTGTAACAAGGATTTGAATTAGG 3'	59.44	
C) Over	LP'22060	5' AACATGTTTGAAGAGGACCTTC 3'	60.99	1260
	RP'22060	5' ATGTTGATCACTGCTGGGCACAT 3'	62.77	
D) Sistema de dos Híbridos	LP'22060	5' ATTAACAAGGCCATTACGGCCATGTTTGA AGAGGACCTTC 3'	71.70	1301
	RP'22060	5' AACTGATTGGCCGAGGCGGCAACTGCTG GGCACATTGC 3'	77.31	
At3g44110				
E) Línea inercial	LP'132923	5' CTTGAAGGTATCTCTTGAGGATGTGTACC 3'	66.04	833
	RP'132923	5' GACGATGCATCTGAATACGTACCAGG 3'	66.17	
F) RT-PCR	LP'132923	5' GTAACCTCTTAGAGAGACTTTG 3'	61.15	257
	RP'132923	5' CACACAGTATATATGTTCTTAGACA 3'	58.02	
OpsHSP18				
G) ORF	LP'sHsp18	5' ACCATGTGCTAATTCCAAG 3'	58.35	492
	RP'sHsp18	5' GATATCTCTGGGAATAAAGG 3'	58.66	
Otros				
H) GW1	LP'GW1	5' GTTGCAACAAATTGATGAGCAATGC 3'	61.30	

I) Vector	LP'pDHB1	5'TTTCTGCACAATATTTCAAGCATACC 3'	59.86	1576
pDHB1	RP'pDHB1	5'GATGTAAGGTGGACTCCTTCT3'	60.61	
J) Actina	LP'Ac	5'GCCAGTGGTCGTACAACCG 3'	64.48	217pb
	RP'Ac	5'CACGACCAGCAAGGTTCGAGACG3'	68.26	
K) LB1	LP'LB1	5'AGCAAGCGGTCCACGCTGGTTT3'	62°C	195 pb

3.4 Manipulación de tejido vegetal

3.4.1 Esterilización de semillas

Las semillas de Arabidopsis fueron esterilizadas con 500 µl de cloro al 20% (v/v) a partir de hipoclorito de sodio comercial al 6%, durante 8 min, tratando de no excederse de los 8 min para evitar dañar el embrión y posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril (500 µl) 5 veces para eliminar residuos de cloro.

3.4.2 Germinación de semillas

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

3.4.3 Experimentos bajo condiciones de estrés abiótico

Los experimentos que se realizaron con las semillas enlistadas en la tabla 1, fueron bajo condiciones de estrés abiótico: salinidad, calor y osmótico. Los tratamientos se aplicaron por separado en la etapa de germinación y en plántulas de 10 días edad. También se realizaron ensayos de recuperación, donde se

emplearon plantas sometidas previamente a condiciones de estrés descritas en la tabla 6.

Tabla 6. Condiciones de los experimentos bajo estrés abiótico.

Experimento	Condiciones	Periodo (estrés)
Germinación	Calor (temperatura): 1) 45°C ± 2°C Salino (concentraciones NaCl en MS): 1) 75 mM 2) 100 mM 3) 150 mM Osmótico (concentraciones Manitol en MS): 1) 150 mM 2) 200 mM 3) 250 mM	Por 2 h, posteriormente a 22°C para germinación Durante el proceso de germinación Durante el proceso de germinación
Plántulas	Calor (temperatura): 1) Plántulas de 10 días 2) 45°C ± 2°C Salino (concentraciones NaCl en MS): 1) Plántulas de 10 días 2) 150 mM	Por 2 h, posteriormente a 22°C para observar la sensibilidad al estrés por calor Durante 15 días para observar la sensibilidad al estrés salino
Plantas	Salino (concentraciones NaCl en MS): 1) Plántulas de 15 días 2) 150 mM	Por 15 días, posteriormente se pasaron a tierra para los ensayos de recuperación hasta observar el fenotipo

3.4.4 Polinización dirigida para la obtención de la cruce de *Arabidopsis thaliana*

Para la cruce de las líneas de *A. thaliana* se llevó a cabo una polinización dirigida. Para ello, se seleccionan botones maduros, de los cuales se desprenden los pétalos, los sépalos y los estambres con la finalidad de tener el pistilo de la línea 1 al descubierto y para obtener el polen de la línea 2, se desprenden los pétalos, los sépalos y el pistilo. Después, se llevó a cabo la polinización dirigida, esto se hace mediante el contacto del pistilo de la línea 1 y el polen de la línea 2, y viceversa. Una vez realizada la cruce se continúa con el análisis de la primera y segunda

generación filial (F1 y F2) para que obtener plantas homocigotas para las dos líneas (Fig. 9).

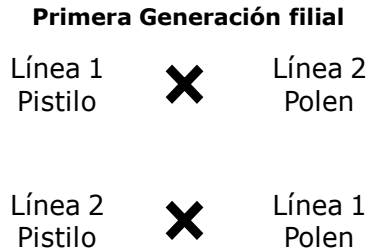


Figura 9. Cruza de las líneas 1 y 2 de *Arabidopsis thaliana*. La cruce es pistilo de la línea 1 con el polen de la línea 2 y viceversa.

3.5 Técnicas de transformación genética

3.5.1 Transformación de células bacterianas

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

3.5.2 Transformación de *Arabidopsis thaliana*

La transformación genética de *A. thaliana* fue realizada utilizando como sistema de transformación a la bacteria de *A. tumefaciens* usando el método “Floral dip” descrito por Zhang *et al.* (2006). Para la transformación de *Arabidopsis*, el primer paso es verificar el inserto de interés en un vector binario dentro de la cepa de *A. tumefaciens*, después se inocula la cepa en 3 ml de medio LB líquido, el cual contiene los antibióticos apropiados para la selección del vector binario y para la bacteria, el cultivo se incubaba a 28°C durante 2 días. Posteriormente, a partir de

este cultivo con una densidad óptica (OD) de 0.2 se inocula en 70 ml de LB líquido con los antibióticos de selección, se crece a 28°C por 5 o 6 h, hasta tener un OD de 0.6 para la transformación genética. Una vez que se tiene la OD, se centrifuga para obtener la pastilla de las células de *Agrobacterium* y se resuspende la pastilla de células en 100 ml de la solución de transformación (anexo 6.2.5). Enseguida se prepara la maceta con 16 plantas de *A. thaliana* aproximadamente de 4 semanas de edad, antes de la inflorescencia, en el caso de que las plantas presenten flores o silicuas maduras se cortan antes de la transformación. Entonces, enseguida se invierten las plantas en la solución de transformación con la suspensión de bacterias durante 15 s. Una vez que transcurrieron los 15 s se colocan en obscuridad, con la finalidad de mantener la humedad durante 16 a 24 h. Transcurridas las 24 h, se cambian a una cámara con un fotoperíodo de 16/8 h luz/obscuridad, hasta la obtención de semillas transgénicas.

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

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

3.6 Técnicas moleculares

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

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

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

3.6.2 Extracción del DNA plasmídico de células bacterianas

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

3.6.3 Extracción de RNA de *Arabidopsis thaliana*

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

3.6.4 Digestión del DNA con enzimas de restricción

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

3.6.5 Reacción de ligación de DNA

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

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

La recombinación homóloga se llevó a cabo mediante la enzima LR clonasa® II, siguiendo las recomendaciones del manual Invitrogen (2004a). El sistema Gateway, es un sistema de recombinación de sitios específicos del bacteriófago lambda. El plásmido recombinante del vector de entrada (pEntry) contiene el DNA de interés, flanqueado por secuencias de recombinación *attL*, estos sitios se recombinan con sitios *attR* del vector destino (pMDC32), utilizando la mezcla de reacción de la LR clonasa (Invitrogen). Esta reacción transfiere la secuencia de interés al vector destino deseado. En el vector destino contiene un gen (*ccdB*) que es letal para la mayoría de las cepas de *E. coli* (Fig. 10; Earley *et al.*, 2006). Esta selección negativa, combinado con la selección positiva del marcador de resistencia a un antibiótico, asegura que las colonias resultantes contienen el plásmido que ha sido objeto a la recombinación. La recombinación fue realizada respecto a una relación molar entre el vector e inserto (1:3).

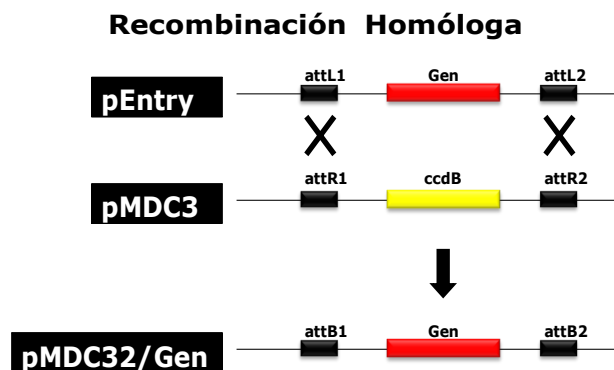


Figura 10. Recombinación del Sistema Gateway mediante la enzima LR Clonasa® II. Recombinación entre los sitios *attL* del vector de entrada y los sitios *attR* del vector destino mediante la enzima LR clonasa. (Earley *et al.*, 2006)

3.6.7 Purificación de DNA por columna

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

3.6.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

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

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

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

IV. RESULTADOS

4.1 DnaJ: genes At5g22060 (*AtDJ2*) y At3g44110 (*AtDJ3*)

4.1.1 Alineamiento del EST (SSHPv-S38) aislado de la biblioteca sustractiva de frijol con DnaJ de *Arabidopsis thaliana*

La secuencia SSHPv-S38, aislada de hojas de frijol de una biblioteca sustractiva bajo condiciones de salinidad, tiene un tamaño de 790 pb, al ser traducida *in silico* codifica para 263 aa, que corresponden a la parte central de las proteínas DnaJ, sin embargo carece del dominio J, el cual está localizado hacia el amino terminal, y de la región C-terminal. Dicha proteína parcial de DnaJ de frijol (263 pb) presenta una identidad de 53.7 y 54.5% con las proteínas AtDJ2 (420 aa) y AtDJ3 (419 aa) de *A. thaliana*, respectivamente (Fig. 11).



Figura 11. Alineamiento tipo Clustal W de la secuencia SSHPv-S38 del frijol con las proteínas DnaJ de *A. thaliana*. Alineamiento de la secuencia SSHPv-S38 aislada de la biblioteca sustractiva de frijol bajo condiciones de estrés, con las proteínas AtDJ2 y AtDJ3 de *A. thaliana*. En sombreado negro indican los aminoácidos idénticos y en gris lo que difieren en la secuencia.

4.1.2 Análisis *in silico* de los genes At5g22060 y At3g44110 que codifican proteínas DnaJ

En esta sección se presenta un análisis *in silico* de los genes At5g22060 y At3g44110 de *A. thaliana*, donde se describe la organización genómica de dichos genes, la identidad que presentan con otras chaperonas moleculares así como los dominios característicos que comparten entre ellas. Finalmente, se describen datos generados por análisis de microarreglos empleando The Bio-Array Resource for Plant Functional Genomics (BAR) de la Universidad de Toronto (<http://bar.utoronto.ca/>), que indican el patrón de expresión de estos genes bajo condiciones de estrés abiótico. De esta manera, se puede inferir en qué procesos están involucradas éstas chaperonas DnaJ en *A. thaliana*.

En la figura 12A se muestra una representación esquemática de la organización genómica de los genes At5g22060 (*AtDJ2*) y At3g44110 (*AtDJ3*) de *Arabidopsis thaliana*. El gen *AtDJ2* tiene un pre-RNA de 2176 pb y está conformado por 5 exones (I al V, cuadros negros) con marco de lectura abierto (ORF) de 1260 pb, por 4 intrones (líneas) y por las regiones 5' y 3'-UTR (cuadros grises). En lo que respecta al gen *AtDJ3*, tiene un pre-mRNA de 2463 pb y consta de 7 exones (I al VII, cuadros negros) que corresponden a un marco de lectura (ORF) de 1032 pb, de 6 intrones (líneas) y las regiones 5' y 3'-UTR (cuadros grises; Fig. 12A). De manera interesante, el gen *AtDJ3* genera dos transcritos. El primero de ellos, *AtDJ3.1* es el resultado de la unión de los 7 exones y el procesamiento de todos los intrones, mientras que el segundo *AtDJ3.2* es el resultado de una retención de intrón, donde además de los exones se mantiene el sexto intrón en el RNA mensajero (Fig. 12B). El primer transcrito *AtDJ3.1*, codifica una proteína de 343 aminoácidos, mientras que el segundo *AtDJ3.2* codifica una proteína más grande de 420 aminoácidos. En la variante de splicing alternativo, el intrón retenido de 167 pb continúa la fase de lectura abierta incluyendo 38 pb de la parte codificable del exón 7 así como 64 pb del UTR3' (región no codificable del exón 7). De esta

(líneas) y las regiones UTRs (cuadros grises) se esquematizan. En la sección B se representan los transcritos generados a partir del gen *AtDJ3*. C) Alineamiento tipo Clustal W de las proteínas DnaJ (*AtDJ2*, *AtDJ3.1* y *AtDJ3.2*). El asterisco (*) indica los aminoácidos idénticos en las tres proteínas. Los números en los cuadros indican el tamaño de los exones.

En la figura 13 se muestra un alineamiento tipo Clustal W resaltando los dominios conservados en las proteínas DnaJ de *A. thaliana* (*AtDJ2*, *AtDJ3.1* y *AtDJ3.2*) y de otras DnaJ de plantas, tales como *Populus trichocarpa* (EEE87460), *Solanum lycopersicum* (AF124139.1), *Oryza sativa* (BAF12693), *Vitis vinifera* (XM_002270326.1) y *Ricinus communis* XM_002514373.1). Como se observa en la figura 13, las proteínas DnaJ mantienen 4 dominios característicos: el dominio J (rojo) el cual contiene un tri-péptido HPD (subrayado), la región rica en glicinas y fenilalanina (verde), el dominio dedo de zinc (azul) que contienen 4 motivos ricos en cisteína (CXXCXGXG; subrayados), y por último el dominio carboxi-terminal (amarillo; Fig. 13). Estos motivos fueron identificados mediante el programa Motif Scan (http://hits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan).

Para analizar la expresión de los genes DnaJ, se utilizó la base de datos de microarreglos de la página The Bio-Array Resource for Plant Functional (BAR) de la Universidad de Toronto, que contiene herramientas de expresión para los genes de *A. thaliana* bajo diferentes condiciones como estrés abiótico o en los etapas del desarrollo. En la figura 14A, se muestra el patrón de expresión del gen *AtDJ3* en las etapas de desarrollo de la planta, observándose la máxima expresión durante las etapas de desarrollo de la semilla (cuadro negro), y en el caso del gen *AtDJ2* la mayor expresión se encuentra en semilla seca (cuadro negro). Con respecto a las condiciones de estrés abiótico, la expresión de los dos genes se observan bajo estrés por calor, mostrando una expresión máxima a tiempos cortos (1 y 3 h) de exposición a temperatura de 38 °C (Fig. 14B; rojo), comparado con el control (Fig. 14B; amarillo).

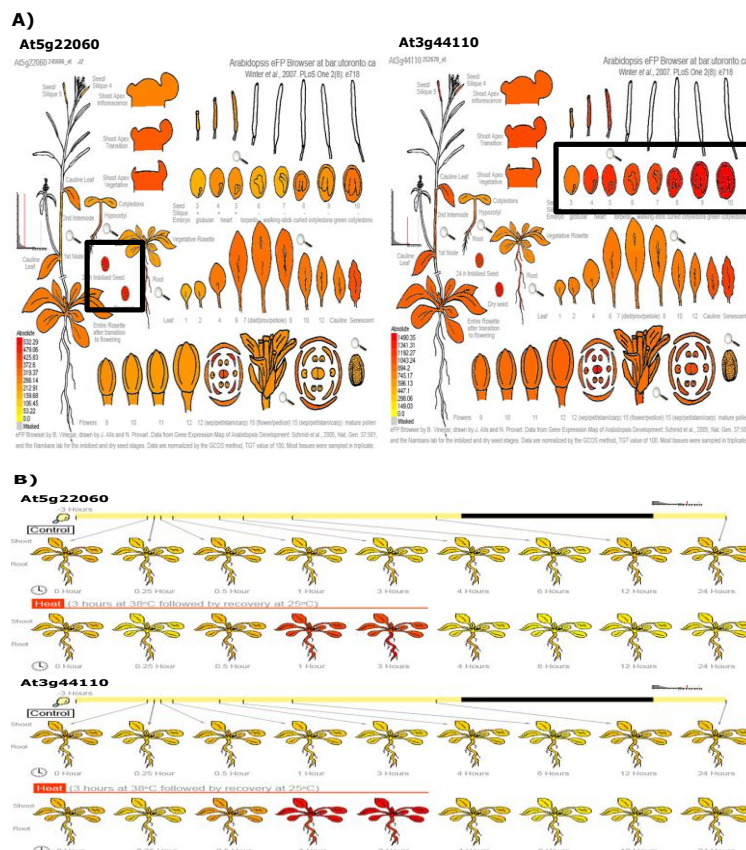


Figura 14. Patrón de expresión de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3* de *A. thaliana*. A) Expresión en las etapas de desarrollo de la planta, B) Expresión bajo condiciones de estrés abiótico. La escala de expresión relativa de los genes se muestra por colores siendo la máxima expresión en rojo y en

amarillo la expresión basal. Estas figuras fueron obtenidas de la página BAR de Toronto (<http://bar.utoronto.ca/>).

Para finalizar se realizó un análisis de los promotores de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3* considerando 2,000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción más la región UTR5'. Las cajas regulatorias presentes en cada uno de los promotores fueron identificadas empleando la base de datos PLACE (A Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements; www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html). En la figura 15, se muestra que los promotores de los dos genes presentan las mismas cajas regulatorias, tales como: los elementos de respuesta a hormonas como auxina, ácido salicílico (SA), giberelina, etileno y ácido abscísico (ABA). Los elementos de respuesta a deshidratación, bajas temperaturas, sal y osmolaridad, así como de respuesta a patógenos y de expresión específica en la embriogénesis. Una de las principales son las cajas CCAAT, que se encuentran localizadas en los promotores de las proteínas de choque térmico (HSP), y que se ubican cerca de los elementos de choque térmico (HSE), la función de esta caja es cooperar con los HSE para incrementar la actividad de las HSP (Fig. 15). La presencia de las secuencias CCAAT en los promotores de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*, correlaciona con los datos de expresión bajo condiciones de calor, se observa la presencia de 1 y 6 cajas CCAAT en los promotores *AtDJ2* y *AtDJ3* respectivamente.

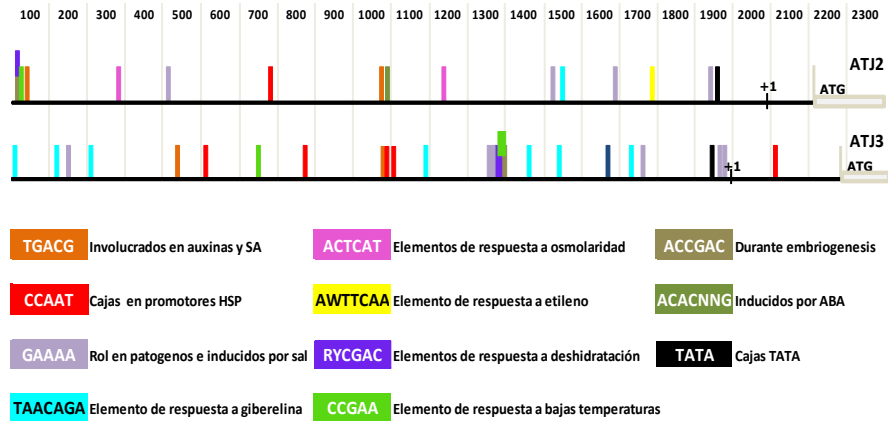


Figura 15. Cajas o secuencias regulatorias presentes en los promotores de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*. Los promotores de los genes DnaJ presentan cajas similares (en colores), el inicio de la transcripción (+1), la caja TATA (negro), y el inicio de la traducción (ATG) se esquematizan.

4.1.3 Identificación de las líneas homocigotas mutantes insercionales de T-DNA de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*

Para la caracterización funcional de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3* se adquirieron líneas insercionales de T-DNA en Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) de la Universidad del Estado de Ohio. Esto con la finalidad de llevar a cabo experimentos de pérdida de función. Se realizó la genotipificación de las líneas insercionales de T-DNA de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*. Para el gen *AtDJ2* (At5g22060) la línea es Salk_071563 y para el gen *AtDJ3* (At3g44110) la línea es Salk_132923, dentro de las cuales la inserción del T-DNA se encuentra ubicada en el primer intrón del gen *AtDJ2* y en el cuarto exón del gen *AtDJ3*, como se muestra en la siguiente figura 16. Para corroborar la homocigosis de cada una de las líneas insercionales, se utilizaron los oligonucleótidos A y E (ver tabla 5) diseñados flanqueando la inserción del T-DNA de las líneas Salk_071563 y Salk_132923 respectivamente (Fig. 16) y para comprobar la inserción del T-DNA fue utilizado el oligo (K; tabla 5) ubicado en el borde izquierdo del T-DNA (flecha en verde; Fig. 16).

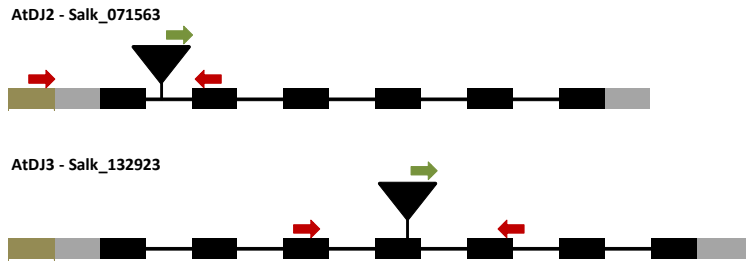


Figura 16. Localización de la inserción de T-DNA en las líneas insercionales Salk_071563 (*AtDJ2*) y Salk_132923 (*AtDJ3*). El promotor se marca en café, los UTR's en gris y los exones en negro, la inserción del T-DNA se indica con el triángulo, los oligonucleótidos "sentido" y "antisentido" de cada una de las líneas insercionales se muestran en flechas en rojo y el oligonucleótido del T-DNA se muestra con la flecha verde.

La homocigosis de las líneas mutantes se corroboró por medio de PCR. En la figura 17B, la línea Salk_071563 que corresponde al gen *AtDJ2* (carril 3) no presenta la amplificación con los oligonucleótidos A (ver tabla 5) los cuales flanquean la inserción del T-DNA. Este resultado nos sugiere que la amplificación de la banda de 986 pb correspondiente ha dicho gen en la planta parental (Col-0; Fig. 17B; carril 2) no se produce por tener la inserción en ambos alelos del gen *AtDJ2*, ya que el tamaño del T-DNA es mayor de 4 Kb por lo que no se logra amplificar con una Taq polimerasa convencional. Adicionalmente, se verificó la presencia del T-DNA en una reacción de PCR en esta línea mutante, utilizando el oligonucleótido universal LB1 que está ubicado en el borde izquierdo del T-DNA (K; tabla 5) y el oligonucleótido "antisentido" (RP') de la línea Salk_071563 (A; tabla 5), obteniendo una banda de 590 pb. Como control el DNA genómico de la Col-0 no presenta dicha banda (Fig. 17C; carril 2). A partir de este experimento se comprobó que la línea insercional es homocigota y que el T-DNA está presente en el gen *AtDJ2*. La línea Salk_132923 que corresponde al gen *AtDJ3* (carril 3; Fig. 17D), no presenta la amplificación con los oligonucleótidos E (ver tabla 5) los cuales flanquean la inserción de T-DNA, y dicha amplificación fue de aproximadamente de 833 pb que corresponde a dicho gen en la planta parental (Col-0; Fig. 17D; carril 2) no se produce por tener la inserción en ambos alelos del gen *AtDJ3*. También, se verificó la presencia del T-DNA, utilizando el oligonucleótido universal LB1 (K; tabla 5) y el oligonucleótido "antisentido" (RP') de

la línea Salk_132923 (E; tabla 5), mostrando una banda de 578 pb, en comparación con el control que es la Col-0 no presenta dicha banda (Fig. 17E; carril 2). Los oligos mencionados anteriormente se esquematizan en la figura 17A, los oligos para corroborar la homocigosis de ambas líneas insercionales de T-DNA, se indican en flechas en rojo y el oligo para comprobar la inserción del T-DNA se representa con la flecha en verde, para ambos genes (*AtDj2* y *AtDJ3*).

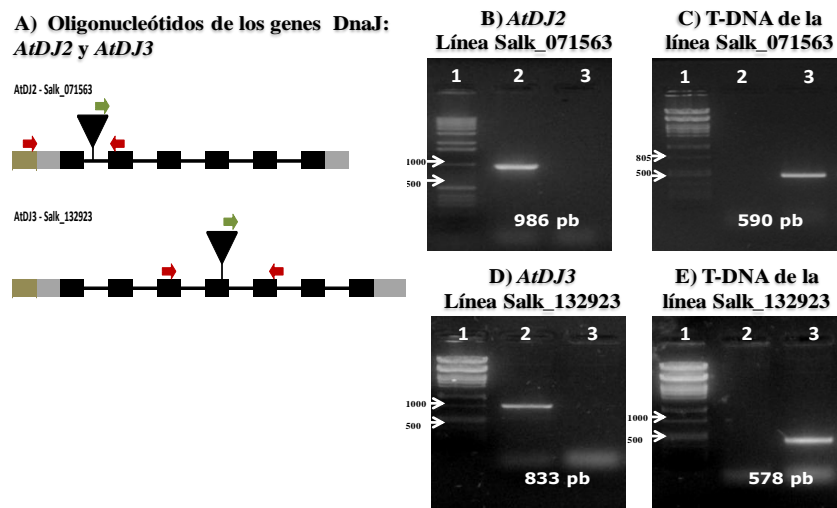


Figura 17. Homocigosis de las líneas insercionales de T-DNA de los genes At5g22060 (*AtDJ2*) y At3g44110 (*AtDJ3*). A) Los oligonucleótidos “sentido” y “anti-sentido” de cada una de las líneas insercionales de los genes *AtDj2* y *AtDJ3*, se muestran en flechas en rojo y el oligonucleótido del T-DNA se muestra con la flecha verde. B) PCR de la línea Salk_071563 con los oligonucleótidos A (tabla 5) dando un tamaño de 986 pb, C) PCR del T-DNA de la línea Salk_071563 con los oligonucleótidos K y RP’22060 A (tabla 5) con un tamaño de 590 pb del gen At5g22060, D) PCR de la línea Salk_132923 con los oligonucleótidos E (tabla 5) que da un tamaño de 833 pb y E) PCR del T-DNA de la línea Salk_132923 con los oligonucleótidos K y RP44110 (E; tabla 5) dando un tamaño de 578 pb. El marcador de peso molecular (carril 1), ecotipo Col-0 (control; carril 2) y la línea de inserción del T-DNA (carril 3).

4.1.4 Ensayos de RT-PCR de las líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*

Después de verificar la homocigosis de las líneas mutantes insercionales de T-DNA, se realizaron ensayos de RT-PCR para comprobar la ausencia de los

transcritos de estos genes (*AtDJ2* y *AtDJ3*). Debido a que el porcentaje de identidad a nivel nucleótidos entre ambos transcritos (*AtDJ2* y *AtDJ3.2*) es alto (71%), diseñamos oligonucleótidos en la región de los 3'-UTR's que es menos conservada (Fig. 18A). En la figura 16B, se observa la ausencia de las bandas correspondientes de los transcritos de ambos genes, es decir, son "knock-out" comparado con la parental Col-0 donde amplifica las bandas de 136 y 321 pb de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*, respectivamente. Como control se muestra el gen de actina.

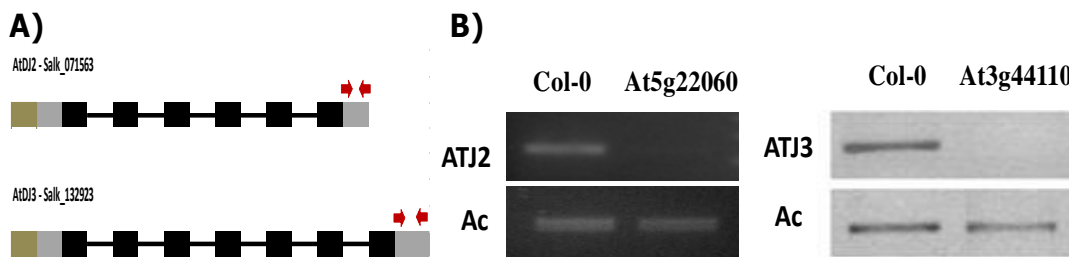


Figura 18. RT-PCR de las líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*. A) Los oligonucleótidos en "sentido" y "anti-sentido", ubicados en los UTR's de cada una de las líneas insercionales de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*, se muestran en flechas en rojo. B) Muestra los ensayos de RT-PCR para comprobar el transcrito de los genes *At5g22060* (*AtDJ2*) y *At3g44110* (*AtDJ3*). La Col-0 (carril 1), las líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes en ambos geles (carril 2) y como control la actina (Ac).

4.1.5 Doble mutante de las líneas insercionales de T-DNA de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*

Cuando analizamos el fenotipo de las líneas mutantes homocigotas insercionales de T-DNA que obtuvimos para cada uno de los genes *DnaJ* (*AtDJ2* y *AtDJ3*) bajo condiciones de estrés salino, observamos un retardo en la velocidad de germinación de dichas mutantes en comparación con la Col-0 bajo diferentes concentraciones de NaCl, como se describe en la figura 22 del apartado 4.1.6.

Con base a este resultado, nos planteamos el objetivo de generar una doble mutante insercional en los genes *AtDJ2* y *AtDJ3* mediante polinización dirigida, para determinar si el fenotipo sería más sensible en ensayos de germinación bajo condiciones de estrés salino.

Después de haber realizado la cruce de las líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3* obtuvimos la primera generación filial (F1). En la figura 19A, se muestra el cuadro de Punnet de la cruce entre las dos líneas mutantes insercionales de T-DNA, la cruce se realizó entre la línea mutante homocigota Salk_071563 que tiene insertado el T-DNA en el gen *AtDJ2* (aa) y además, contiene el *loci* silvestre (AA) del parálogo (*AtDJ3*) y la línea Salk_132923 que es la mutante homocigota para el gen *AtDJ3* (bb) y silvestre para el gen *AtDJ2* (BB), dando como resultado líneas heterocigotas insercionales de T-DNA para ambos genes (AaBb).

Posteriormente, se verificó la presencia del T-DNA para ambos genes (*AtDJ2* y *AtDJ3*) mediante PCR utilizando un oligonucleótido diseñado en el T-DNA (K; tabla 5) y el oligonucleótido “antisentido” correspondiente al gen (A y E de los genes At5g22060 y At3g44110, respectivamente; tabla 5). A partir de las seis líneas de la primera generación filial (F1), obtuvimos cuatro líneas mutantes insercionales que presentan el T-DNA para el gen *AtDJ2* (Fig. 19B; carriles 4, 5, 6 y 8), por otro lado las seis líneas mutantes del gen *AtDJ3* presentan el T-DNA (Fig. 19D; carriles 2-8), como control de T-DNA, se utilizaron las líneas mutantes sencillas de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3* (carril 2; Fig. 19B y D, respectivamente). Adicionalmente, demostramos la amplificación de la banda esperada para la heterocigosis de las líneas mutantes insercionales de T-DNA para ambos genes mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos diseñados flanqueando la inserción del T-DNA (A y E para los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*, respectivamente). A partir de seis líneas de la primera generación, se obtuvieron cinco líneas heterocigotas para ambos genes *AtDJ2* (Fig. 19C; carriles 3, 4, 5, 6 y 8) y *AtDJ3* (Fig. 19E; carriles 4, 5, 6, 7 y 8). Como control para la heterocigosis de ambos genes utilizamos el ecotipo parental

Col-0 (Fig. 19C y E, carril 2). Posteriormente, para la primera generación filial (F1), seleccionamos la línea 2 (se indica con el asterisco; Fig. 19) para obtener la segunda generación filial (F2).

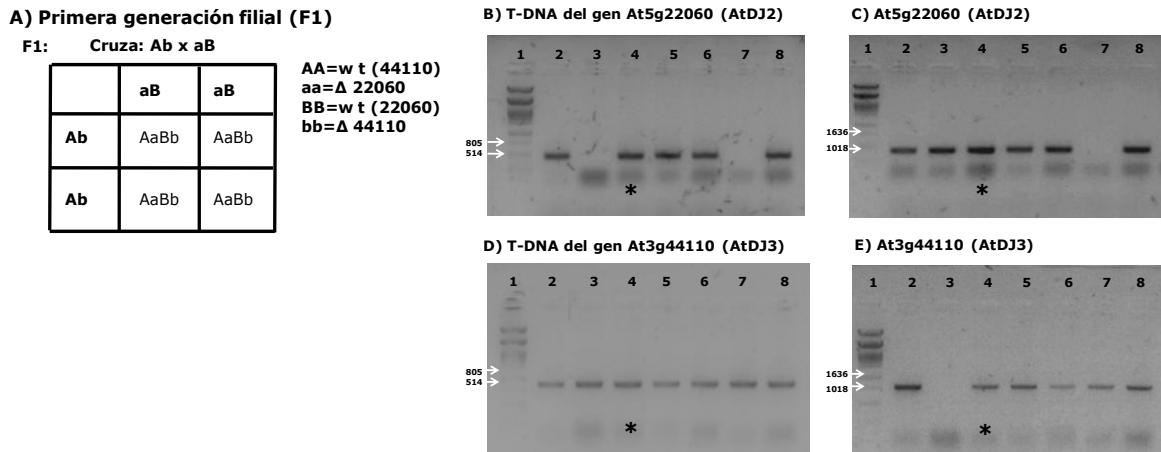


Figura 19. PCR de la primera generación filial (F1) de la cruce de las líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*. A) Cuadro de Punnet de la primera generación filial (F1) de la cruce de las líneas mutantes sencillas de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*, heterocigotas para ambos genes. B) y D) PCR para la inserción del T-DNA de las líneas de la primera generación filial (F1) de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3* respectivamente, para la inserción del T-DNA, el control son las líneas mutantes sencillas de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3* en el carril 2 y las seis líneas mutantes en los carriles 3-8. El marcador de peso molecular en el carril 1. C) y E) PCR para la heterocigosis de las líneas mutantes de la primera generación filial (F1) de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*, respectivamente, para la heterocigosis el control es el ecotipo parental Col-0 en el carril 2 y las seis líneas mutantes en los carriles 3-8.). El asterisco (*) indica la línea para la segunda generación filial (F2).

De la línea 2 de la primera generación filial (F1) de la cruce de las líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*, obtuvimos semillas de la segunda generación filial (F2). Enseguida, en una charola fueron sembradas 50 semillas, para identificar la doble mutante insercional homocigota en ambos genes. La probabilidad de obtener la doble mutante es de 1:16 basándonos en el cuadro de Punnet (Fig. 20A), por lo tanto de las 50 semillas, tendríamos una proporción de 3 líneas dobles mutantes.

De las 50 líneas mutantes insercionales de T-DNA de la segunda generación filial (F2), se identificaron las líneas homocigotas para la inserción del T-DNA de cada gen, las cuales no amplifican la banda del producto de PCR esperado con oligonucleótidos que bordean la inserción de T-DNA. En la figura 20B, se muestran las posibles homocigotas para el gen *At5g22060* (*AtDJ2*), las cuales fueron 4, 18, 26, 34, 36, 38, 45 y 46 (flechas) y el resto corresponden a las heterocigotas para este gen. Para el gen *At3g44110* (*AtDJ3*), las líneas mutantes fueron las siguientes 11, 13, 20, 21, 22, 23, 26, 30, 32, 36, 38, 46, 48 y 50 (flecha) las cuales son posibles homocigotas para el gen *AtDJ3* (Fig. 20C). Por lo tanto, al comparar las posibles homocigotas de cada uno de los dos genes, obtuvimos que las líneas mutantes 26, 36 y 46 (flechas en rojo) son las dobles mutantes insercionales para ambos genes (*AtDJ2* y *AtDJ3*). El control para la homocigosis de ambos genes fue el ecotipo parental Col-0.

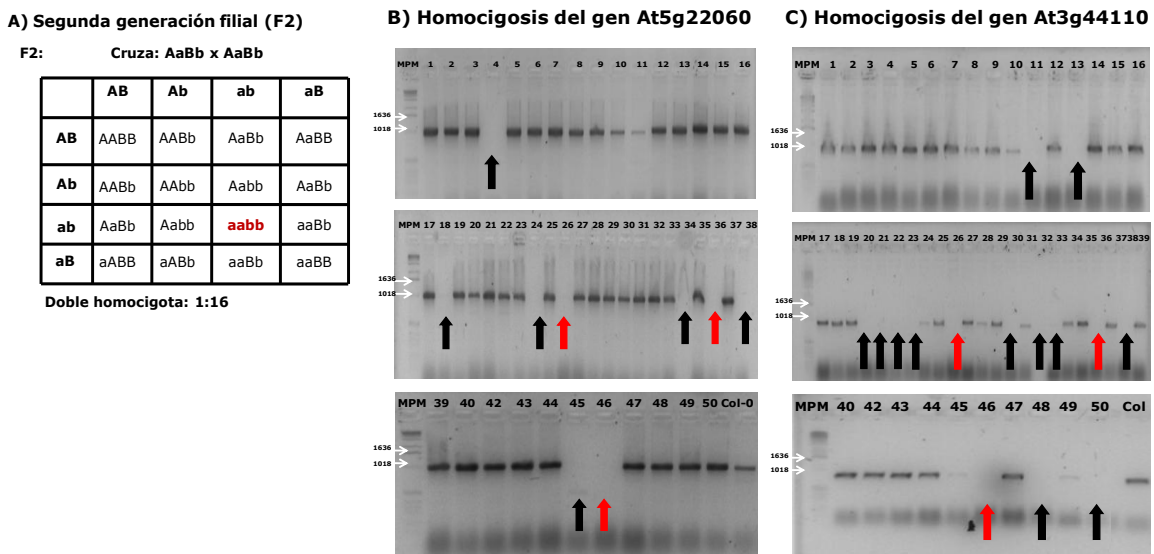


Figura 20. PCR de la segunda generación filial (F2) de la cruce de las líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes *At5g22060* (*AtDJ2*) y *At3g44110* (*AtDJ3*). A) Cuadro de Punnet de la segunda generación filial (F2) de la cruce de las líneas mutantes sencillas de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*, la proporción de obtener la doble mutante de ambos genes es 1:16 (aabb en rojo). B) PCR para la homocigosis del gen *AtDJ2* de las 50 líneas mutantes insercionales, las flechas indican las posibles mutantes para el gen *AtDJ2*. C) PCR de la homocigosis del gen *AtDJ3* de las 50 líneas mutantes, las flechas indican las posibles mutantes para el gen *AtDJ3*. En flechas

de color rojo se indican las posibles dobles mutantes de ambos genes y el control para la homocigosis es el ecotipo parenteral Col-0.

Una vez que fueron identificadas las dobles mutantes insercionales de T-DNA de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3* (líneas 26, 36 y 46), verificamos la presencia del T-DNA para ambos genes (*AtDJ2* y *AtDJ3*) mediante PCR. La amplificación de la banda de T-DNA, fue a partir del oligonucleótido diseñado en el T-DNA (K; tabla 5) y el oligonucleótido “antisentido” correspondiente al gen (A y E de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*, respectivamente; tabla 5). En la figura 21A y B, solamente se muestra la presencia del T-DNA de la línea doble mutante 46 (carril 2) para ambos genes (*AtDJ2* y *AtDJ3*). De este último análisis de PCR para corroborar la localización del T-DNA insertado en cada gen en cuestión, obtuvimos que la línea doble mutante insercional de T-DNA 46 (denominada *atdj2-atdj3-46*) presenta la inserción de los dos T-DNA en cada gen y es homocigota para cada inserción de T-DNA.

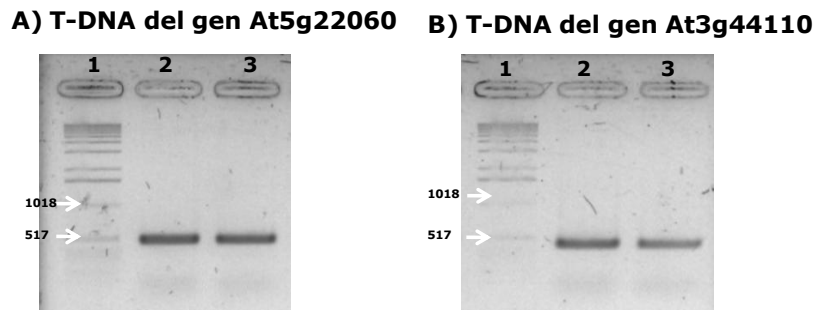


Figura 21. PCR del T-DNA de la segunda generación filial (F2) de las líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes *At5g22060* (*AtDJ2*) y *At3g44110* (*AtDJ3*). A) y B) La presencia del T-DNA de la línea doble mutante para ambos genes (46; carril 2) y como control del T-DNA tenemos la línea mutante heterocigota de ambos genes de la primera generación filial (F1; carril 3) y el marcador de peso molecular (carril 1).

4.1.6 Análisis del fenotipo de las mutantes sencillas (*atdj2* y *atdj3*) y la doble mutante (*atdj2-atdj3-46*) bajo condiciones de estrés abiótico

Con la finalidad de analizar el fenotipo de las mutantes sencillas (*atdj2* y *atdj3*) y la doble mutante (*atdj2-atdj3-46*) de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3*, realizamos

experimentos en germinación bajo condiciones de estrés salino (NaCl). Estas mutantes fueron probadas en experimentos de germinación en placas de MS bajo diferentes concentraciones de NaCl (75, 100, 125 mM) y en placas de MS sin NaCl. En la figura 22, se muestran las gráficas del porcentaje de germinación bajo estrés salino a los 6, 8 y 10 días de las líneas mutantes sencillas, de la doble mutante y del control Col-0 (Fig. 22). En condiciones sin estrés, se observó que a los 6 días de germinación (Fig. 22A) existen diferencias en el porcentaje de germinación entre las líneas mutantes *atdj3* y *atdj2-atdj3-46* (azul y rojo, respectivamente) mostrando una disminución en la velocidad de germinación aproximadamente de 62 y 43% respectivamente, comparándolas con la Col-0 (negro). Respecto a la otra línea mutante *atdj2* (verde) no se observaron diferencias significativas con respecto al control Col-0 en la velocidad de germinación sin estrés. Sin embargo, a los 8 y 10 días (Fig. 22B y C, respectivamente) podemos observar que todas las líneas mutantes (*atdj2*, *atdj3*, *atdj2-atdj3-46*) alcanzan el 100% de germinación como el ecotipo parental Col-0.

Bajo condiciones de estrés (NaCl), a los 6 días de germinación las líneas mutantes sencillas *atdj2* y *atdj3* mostraron un retraso en la velocidad de germinación cerca del 56 y 90% a 75 mM, 70 y 85% a 100 mM en comparación con la Col-0 (Fig. 22A). Conforme pasa el tiempo, por ejemplo, a los 8 y 10 días de tratamiento, las líneas mutantes sencillas *atdj2* y *atdj3* tienden a alcanzar 100% de germinación, excepto en la concentración de 125 mM a los 10 días en donde la línea *atdj3* llegó al 60% (Fig. 22B y C).

Interesantemente, en la doble mutante (*atdj2-atdj3-46*) observamos un fenotipo de mayor retraso en la velocidad de germinación bajo condiciones de estrés salino, por ejemplo a las concentraciones mayores (100 y 125 mM) a los 6 días la doble mutante aun no ha germinado (Fig. 22A). A los 8 días, a concentraciones de 100 y 125 mM se observa un retraso del 83 y 97% respectivamente, en comparación con el control Col-0 (Fig. 22B). Finalmente, a

los 10 días de tratamiento, la doble mutante apenas alcanza un porcentaje de germinación de aproximadamente 60 y 20% a las concentraciones de 100 y 125 mM, respectivamente.

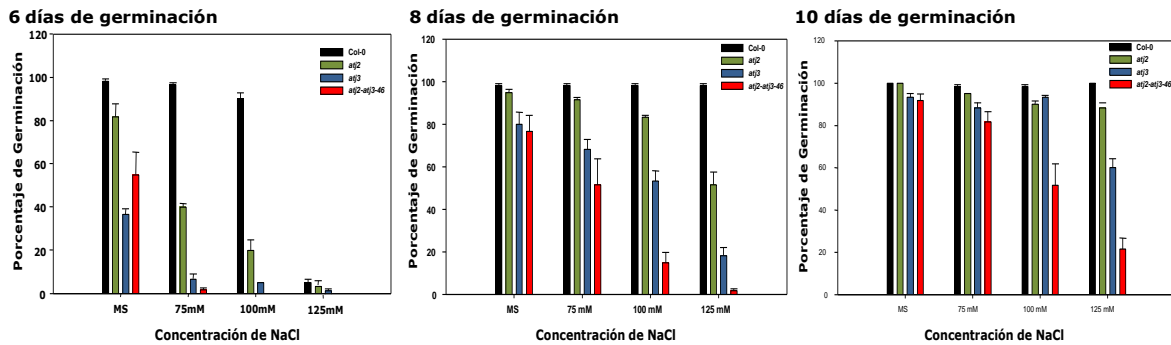


Figura 22. Análisis del fenotipo de líneas mutantes sencillas (*atdj2* y *atdj3*) y la doble mutante (*atdj2-adj3-46*) bajo condiciones de estrés salino. A), B) y C) Gráficas del porcentaje de germinación a los 6, 8 y 10 días bajo diferentes concentraciones de NaCl (75, 100 y 125 mM) y como control el medio MS sin NaCl. Las barras representan el porcentaje de germinación de cada una de las líneas mutantes sencillas (*atdj2* y *atdj3*; verde y azul, respectivamente) y la doble mutante (*atdj2-adj3-46*; rojo) y el control Col-0 (negro). Cada experimento se realizó por triplicado.

4.1.7 Sobreexpresión del gen *AtDJ2* en *Arabidopsis thaliana*

Respecto a la sobreexpresión del gen *AtDJ2* (At5g22060) de *A. thaliana*, el plásmido G83687 (ver Materiales y Métodos; tabla 3) fue obtenido de la página Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (Signal), el cual contiene el marco de lectura abierta (ORF) del gen *AtDJ2* en el vector pENTR223fi. Para verificar que el gen *AtDJ2* estuviera clonado en el vector pENTR223fi se diseñaron oligonucleótidos específicos (C; tabla 5) amplificando un fragmento de 1260 pb correspondiente al ORF (Fig. 23).

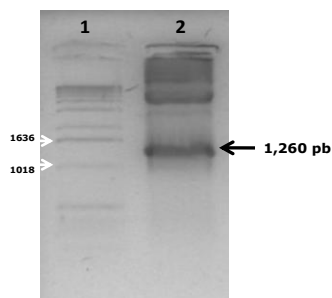


Figura 23. Amplificación del ORF *AtDJ2* en el vector pENTR223fi para la sobreexpresión en *A. thaliana*. La amplificación del ORF *AtDJ2* con un tamaño de banda de 1260 pb (carril 2) y el marcador de peso molecular (carril 1).

Posteriormente, el fragmento del gen *AtDJ2* en el vector de entrada (pEntry) fue recombinado al vector destino (pMDC32) para ser sobreexpresado en *Arabidopsis*. En la figura 24, se muestra la amplificación del gen *AtDJ2* en el vector destino pMDC32.

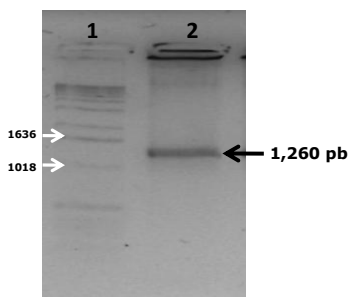


Figura 24. Amplificación del ORF del gen *AtDJ2* en el vector pMDC32 en *E. coli*. El tamaño del ORF del gen *AtDJ2* es de 1,260 pb (carril 2) y el marcador de peso molecular (carril 1).

Para la transformación genética de *A. thaliana*, primero se realizó la transformación de *A. tumefaciens* utilizando el vector pMDC32, el cual tiene subclonado el ORF del gen *AtDJ2*. Una vez transformadas las células de *A. tumefaciens* se verificó por medio de PCR en colonia la presencia del gen *AtDJ2*, con los oligonucleótidos C (tabla 5).

De diferentes colonias seleccionadas al azar, obtuvimos la amplificación del fragmento esperado de 1260 pb, y elegimos la clona 1 (*AtDJ2*-pMDC32) para utilizarla en la transformación genética de *A. thaliana* (Fig. 25; carril 2).

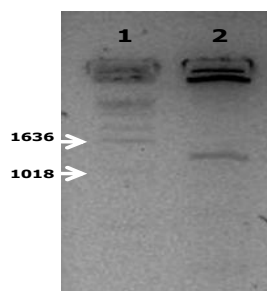


Figura 25. PCR de colonia del gen *AtDJ2* en el vector pMDC32 en *A. tumefaciens*. Amplificación de un fragmento de 1260 pb del gen *AtDJ2* en *A. tumefaciens* (clona 1; carril 2) y el marcador de peso molecular (carril 1).

Después de la transformación de *A. thaliana*, estamos en la etapa de selección con el antibiótico de resistencia para obtener líneas transformantes.

4.1.8 Construcción del vector “bait” (pDHB1-*AtDJ2*) para el sistema de dos híbridos

En el presente trabajo otro de los objetivos que se planteó, fue la construcción del vector anzuelo o “bait” pDHB1 con la fusión del ORF del gen *AtDJ2* que codifica para la proteína DnaJ (*AtDJ2*). Este vector fue diseñado para identificar y caracterizar los posibles ligandos de la proteína *AtDJ2* mediante el sistema de dos híbridos “split-ubiquitin” de *Saccharomyces cerevisiae* (Biotech Dualsystems, 2007).

Este sistema consiste en fusionar la proteína de interés (anzuelo o “bait”) al N-terminal de una proteína pequeña de anclaje de membrana (Ost4 proteína de la levadura), y al C-terminal a un cassette reportero compuesto por un fragmento del C-terminal de la ubiquitina (Cub) unido al factor de transcripción (LexA-VP16). Una segunda proteína (presa o “prey”), en este caso una biblioteca de cDNA de *A. thaliana*, se fusiona a un fragmento N-terminal de la ubiquitina mutada (NubG; cambio de una isoleucina por una glicina en la posición 3, reduciendo la afinidad entre Cub y NubG). Si el “bait” y el “prey” interactúan, obligan a NubG y Cub a

entrar en contacto, resultando en la reconstitución del “split-ubiquitin”. Inmediatamente, el “split-ubiquitin” es reconocido por proteasas (UBPs) específicas de la ubiquitina, cortan la cadena polipeptídica entre Cub y Lex-VP16. De esta manera, el factor de transcripción es liberado y es translocado al núcleo, donde activa la transcripción de los genes reporteros. Los genes reporteros usados en este sistema son los marcadores de auxotrofia (*HIS3* y *ADE2*), y *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa. De esta forma, la interacción de dos proteínas, resultará en el crecimiento de la levadura en un medio selectivo y el desarrollo del color en los ensayos (Fig. 26).

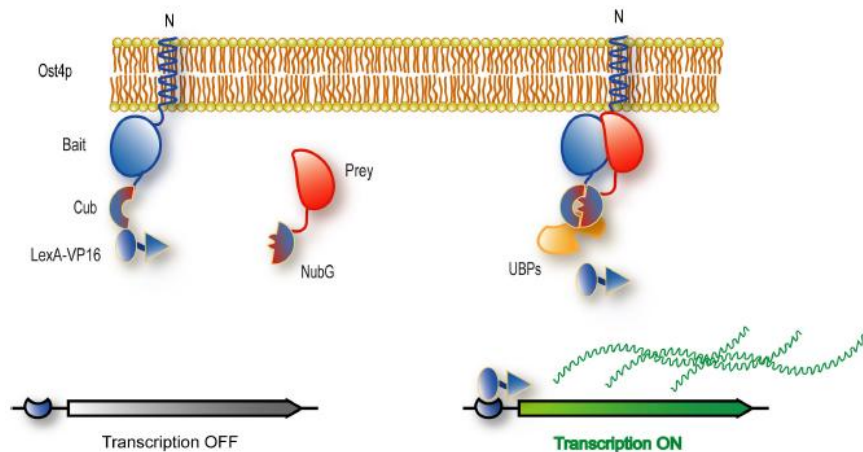


Figura 26. Sistema de dos híbridos “split-ubiquitin” de *S. cerevisiae*. Interacción entre bait” y el “prey”, obligan a NubG y Cub a entrar en contacto, resultando en la reconstitución del “split-ubiquitin”. El “split-ubiquitin” es inmediatamente reconocido por proteasas (UBPs) específicas a la ubiquitina, cortan la cadena polipeptídica entre Cub y Lex-VP16. Entonces el factor de transcripción es liberado y es translocado al núcleo, donde activa la expresión de genes reporteros.

Para la construcción del vector “bait”, fueron diseñados oligonucleótidos con sitios de reconocimiento para la enzima *Sfi1*, con la finalidad de ligar el producto de PCR de manera dirigida al vector pDHB1 (oligonucleótidos D; tabla 5).

Una vez que se diseñaron los oligonucleótidos, se amplificó el ORF del gen *AtDJ2* (tamaño de 1,301 pb) a partir del vector *AtDJ2*-pMDC32 por medio de PCR. Para la amplificación se utilizó una Taq polimerasa de alta fidelidad (Taq Phusion;

Finzymes). En la figura 27, se muestra la amplificación del gen *AtDJ2* para el sistema de dos híbridos.

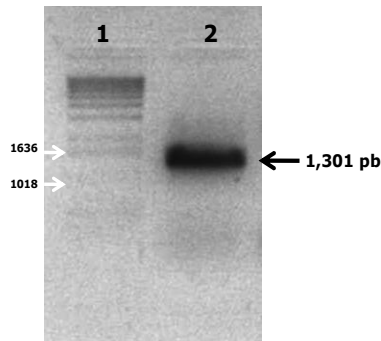


Figura 27. Amplificación del gen *AtDJ2* para el sistema de dos híbridos “split-ubiquitin” de *S. cerevisiae*. La amplificación con los sitios de corte para la enzima *Sfi*1 y la región codificante del gen *AtDJ2* (carril 2) el tamaño de la banda es de 1301 pb y el marcador de peso molecular (carril 1).

Después se purificó el producto de la PCR y se cortó con la enzima *Sfi*1. Esta endonucleasa reconoce la secuencia GGCCNNNN'NGGCC (el sitio de corte se indica por el apostrofe). Los sitios de corte de *Sfi*1 en el vector pDHB1 del sistema DUALhunter son GGCCATTA'CGGCC y GGCCGCCT'CGGCC, permitiendo que los fragmentos digeridos sean ligados en la orientación correcta.

En la figura 28, se muestra la digestión del producto de la PCR que corresponde al ORF del gen *AtDJ2* (carril 4) y del vector pDHB1 (carril 3), al igual que el vector sin digerir (carril 2). Enseguida de la digestión de ambos DNAs, se realizó la ligación con una relación molar 1:3 (vector:inserto).

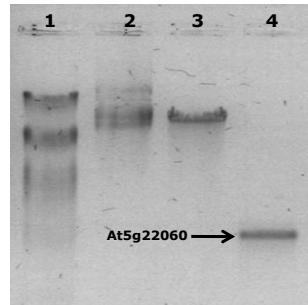


Figura 28. Digestión y ligación del gen *AtDJ2* en el vector pDHB1 para el sistema de dos híbridos “split-ubiquitin” de *S. cerevisiae*. Digestión del gen *AtDJ2* y del vector pDHB1 con la enzima *Sfi1* (carril 3 y 4), el vector sin digerir (carril 2) y el marcador de peso molecular (carril 1).

Posteriormente, en las células de *E. coli* la ligación fue transformada, de las cuales por medio de la PCR en colonia se identificaron las células que contienen el fragmento de interés. En la figura 29, se muestran 30 colonias que se seleccionaron al azar, donde se observa que las identificadas en los carriles en los carriles 3, 5, 7, 8, 30 y 31 (flecha en negro) amplifican el producto de PCR esperado para la construcción del vector pDHB1-*AtDJ2*.

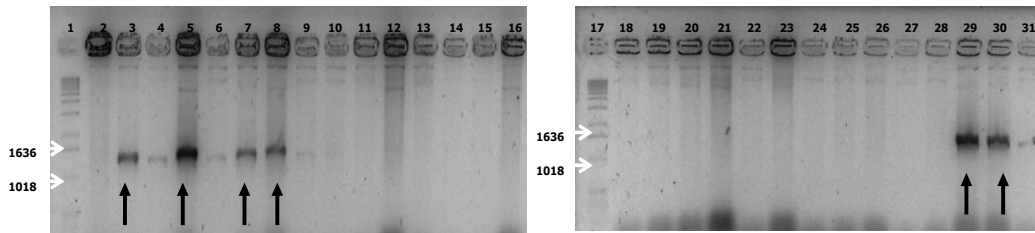


Figura 29. Amplificación del gen *AtDJ2* en el vector pDHB1 en *E. coli* para el sistema de dos híbridos “split-ubiquitin” de *S. cerevisiae*. PCR de colonia, carril 1, marcador de peso molecular y carriles 2 al 31, colonias seleccionadas al azar. Las colonias que contienen el inserto (*AtDJ2*, 1301 pb) se indican con la flecha negra.

Posteriormente, a partir de las 6 colonias que dieron una amplificación positiva para el gen *AtDJ2*, fue extraído el DNA plasmídico pDHB1, el cual fue digerido con la enzima *Sfi1*. En la figura 30B, se muestra la digestión del plásmido pDHB1-*AtDJ2*-1 (carril 2), observándose la banda de 1,301 pb correspondiente al ORF del gen *AtDJ2*.

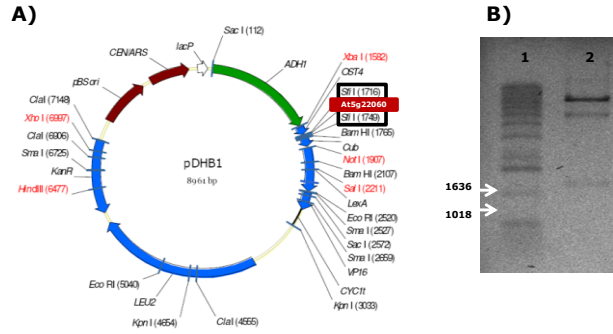


Figura 30. Digestión del plásmido pDHB1-AtDJ2-1 con la enzima *Sfi*I. A) Vector pDHB1 con los sitios de corte de la enzima *Sfi*I (cuadro en negro) flanqueando al gen *AtDJ2* (cuadro en rojo). B) Digestión del plásmido pDHB1-AtDJ2-1 con la enzima *Sfi*I (carril 2) y el marcador de peso molecular (carril 1).

Adicionalmente, se mando secuenciar el plásmido pDHB1-AtDJ2-1 en ambos sentidos con los oligonucleótidos J (tabla 5), para verificar la secuencia del gen *AtDJ2* en el vector pDHB1.

4.2 Gen *OpsHSP18* de *Opuntia streptacantha*

En un trabajo previo de nuestro grupo de investigación Ochoa-Alfaro *et al.*, 2010 (datos no publicados), se aisló una secuencia de cDNA que codifica una proteína de choque térmico de *Opuntia streptacantha* (*OpsHSP18*). Esta secuencia de cDNA mide 1130 pb e incluye 486 pb del ORF (rojo) así como 99 y 545 pb correspondientes al 5' y 3'-UTR (negro) respectivamente (Fig. 31A). La proteína *OspHSP18* tiene un tamaño de 161 aa con un peso molecular estimado de 18.34 kDa (Fig. 31B).

A)
Secuencia de cDNA:
 gggggccatcaaaaacagagcaactcaaaaagcatcgatccacaatc
 caagcttccaaactccctccatcaagttcgatcaatccctaaattt
 cccaacc**ATGTGCGTAATTC**CAAGCT**CTTTGGACCCGAAAGACC**
AACGTATTCGACCCATTCTCCCAAGCT**TTTGGACCCATTGAGG**
GGTCTTATCCTCGCCCTTCCAAGCT**GTTCAGCGAGTTCAGCTGC**
CCGAGAGACATCGCAGTTGTGAGT**ACGAGGTTAGACTGGAAGGA**
ACCCGGAAGCCACGTTTCAAGT**GGATCTTCTGGGGTAAAGA**
AAGAGGAGGTGAAAGTGGAGTTGAGG**GGGCAAGATTCTCCAGAT**
CAGTGGCAGAGAACCAAGAGCAGGAGGGAAGAATGACAAGTGG
CACCGTGGAGCGTCAAGTGGCAAGTTCTCCGGCATTCCGCC
TCCCAGAAATGCCAAGTGGAGGAGTGAAGGTCGAATGGAGAA
CGGTGCTTACAGTGACTGTTCTTAAGTTGAAGAAAGAGCCCT
GAGGTGAAGACCATTGATATCTCTGGGACTAAaggggaggaagt
 gtgaaagagagcaaaatgacgtgaatatggggtgagctgtgttg
 gctttgatgcttcaggagattttatgattgaaataaagatcata
 tataattgatgtatatgtctctgtaatttgcggttctgtgagt
 gagtacaactttgtttatgtaaaagtgcggttattcattccaaa
 tttgtgtttctctctctctgtagaaaaaaaataaagaagactt
 gtggyccgctccgcccctcgagaactcttaaacatctttggggcgg
 cccccagaaatgaactgggccaactgttcttaccagagatctggcc
 gacaagcttggattctcaacaaaaaacagggcagcgtctg
 acaatccaatgagtcgagtccttcggatgtaaaaggtcaacgagcc
 gcatcaattatccccctggctctogaacagtattctagatctgca
 cttgaaactccaacgggtgctgattctacgaaactggccctgctatct
 tgcattggtggagacatgctccat

B)
Proteína de 161 aa:
 MSLIPSFVGRKTNVDFPFLDVPDFEG
 FLSSALSNVQPSAARETSQFVSTRVDWK
 ETPEAHVFKVDLPGVKKEEVKVEVEEGRI
 LQISGERTKEQEEKNDKWHRVERASGKFL
 RFRRLPENAKMEEVKAAMENGLTVTPK
 VEEKKPEVKTIDISGN

Figura 31. Secuencias de cDNA y de proteína del gen *OpsHSP18* de *Opuntia streptacantha*.

A) Secuencia de nucleótidos del cDNA obtenido en la biblioteca de cDNA de *O. streptacantha*, la región codificante de 486 pb se indica en rojo. B) Secuencia de aminoácidos de la proteína de OpsHSP18 de *O. streptacantha*.

Un árbol filogenético con 19 proteínas que codifican para proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSP) de *A. thaliana* y la proteína OpsHSP18 de *O. streptacantha*, fue construido (Fig. 32). Las proteínas sHSP de Arabidopsis se clasifican en base a su localización intracelular, por ejemplo se han clasificado en citoplasmáticas (CI, CII y CIII), de plastidios (Clase P), de retículo endoplásmico (Clase ER) y de mitocondria (Clase M). Como se observa en esta figura, la proteína OpsHSP18 de nopal se agrupa con las proteínas citoplasmáticas de la clase 1 de Arabidopsis. La clasificación de las proteínas sHSP se observa de la siguiente manera: la clase citoplasmática I incluye seis proteínas de *A. thaliana* y la de nopal; la clase II contiene dos y la clase III presenta una. Mientras que la clase del retículo endoplásmico (ER) muestra una; la de mitocondria tiene dos y la de plastidios contiene tres y además, cuatro relacionadas a la clase I y dos relacionadas a la clase P (Fig. 32).

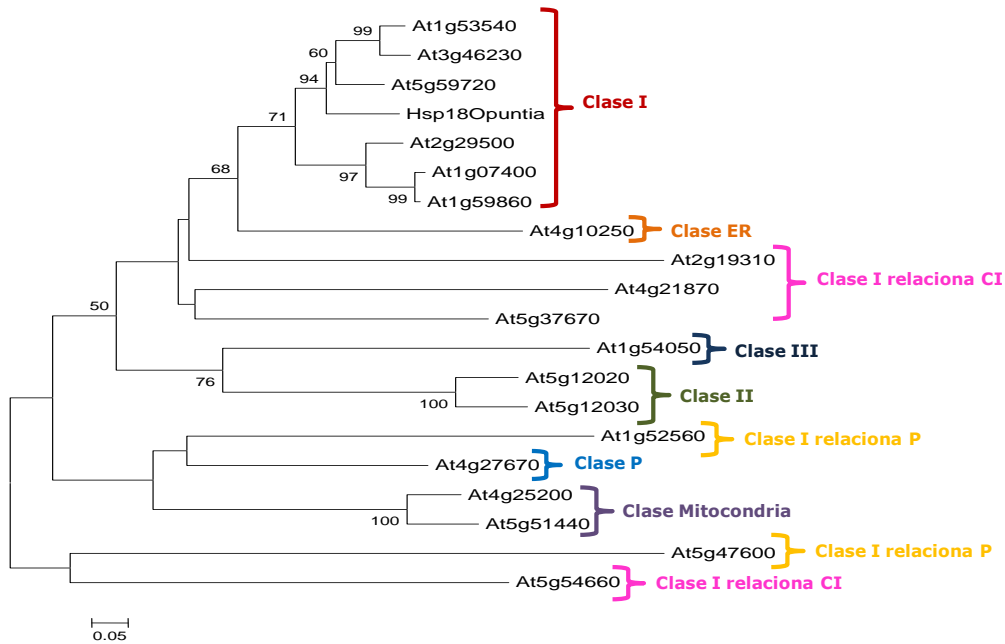


Figura 32. Árbol filogenético de las proteínas sHSP de *A. thaliana*. El árbol filogenético por el algoritmo ClustalW del DNASTAR empleando las secuencias de aminoácidos de las 19 proteínas de *A. thaliana* y la proteína OpsHSP18 de *O. streptacantha*.

Como se observa en la figura 32, la OpsHSP18 de nopal presenta una mayor identidad con proteínas sHSP citoplasmáticas de la clase 1 de Arabidopsis: 75.6 (At3g46230), 77.1 (At1g53540), y 77.2% (At5g59720).

En el alineamiento entre las proteínas OpsHSP18 y At5g59720 que se muestra en la figura 33, se puede observar el dominio conservado α -cristalino característico de estas proteínas sHSP (rojo). Dentro de este dominio, la firma característica es AxxnGvL (subrayado; Fig. 33).

```

At5g59720 MSLIPSIFGGRRSNVDFPFSQDLWDPFEGFFTPS-SALANASTARDVAaftnarv DWKET 59
OpsHSP18 MSLIPSFSGSRKTNVDFPFSLDVWDPFEGFLSSALSNVQPSAARETSQFVSTRV DWKET 60
*****:*:*:***** *:*****::: * : :*:**:: *..:*****

At5g59720 PEAHVFKADLPGLKKEEVKVEVEDKNVLQISGERSKENEKNDKWHRVERASGKFMRRFR 119
OpsHSP18 PEAHVFKVDLPGVKKEEVKVEVEEGRILQISGERTKEQEEKNDKWHRVERASGKFLRRFR 120
*****.***:*:*****: .:*****:*:*****:*****:***

At5g59720 LPENAKMEEVKATMENGVLTVVVPKAEKKPQVKSIDISGAN 161
OpsHSP18 LPENAKMEEVKAAMENGVLTVVTPKVEKKPEVKTIDISGN- 161
*****.***:*:*****.***.***.***:*:*****

```

Figura 33. Alineamiento tipo Clustal W del dominio α -cristalino de la proteína OpsHSP18 de *O. streptacantha* y la proteína At5g59720 de *A. thaliana*. El dominio α -cristalino se muestra en rojo y la firma característica AxxnGvL del dominio α -cristalino se encuentra subrayado.

De este modo, para analizar el patrón de expresión del gen At5g59720, el cual presenta la mayor identidad (77.2%) con el gen *OpsHSP18* de nopal, se utilizó la base de datos de microarreglos de la página AtGenExpress (<http://www.weigelworld.org/resources/microarray/AtGenExpress>). En la figura 34, se puede observar que el gen At5g59720 se induce bajo condiciones de estrés abiótico, presentando una mayor expresión en raíz bajo condiciones por frío, osmótico, salino y por calor. Mientras que en la parte aérea la expresión se observó en estrés osmótico y por calor.

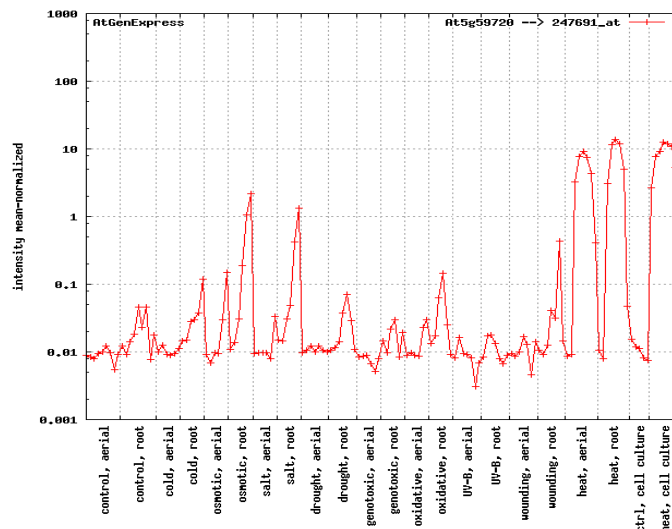


Figura 34. Patrón de expresión del gen At5g59720 de *A. thaliana*. Expresión bajo condiciones de estrés abiótico en raíz como en la parte aérea de la planta. Se muestra la intensidad media normalizada de la expresión del gen. Esta figura fue obtenida de la página AtGenExpress (<http://www.weigelworld.org/resources/microarray/AtGenExpress>).

4.2.1 Análisis de la expresión del gen *OpsHSP18* en *O. streptacantha* bajo condiciones de estrés abiótico

Para realizar el análisis de la expresión del gen *OpsHSP18* de nopal bajo condiciones de estrés abiótico se tomaron muestras del nopal *Opuntia streptacantha* sometidas a estrés hídrico en un invernadero con las siguientes condiciones: Luz-Riego (LR), Luz-Sequía (LS), Sombra-Riego (SR) y Sombra-Sequía (SS) durante períodos de 15, 30 y 45 días. La condición de sombra se llevo a cabo colocando en la parte superior de las plantas una malla sombra de 75% a diferencia de la condición de luz que no incluye esta malla. Esta condición de sombra disminuye el agobio lumínico y la temperatura simulando el efecto de plantas nodrizas en el desierto.

En la figura 35, se muestra el análisis de RT-PCR punto final del gen *OpsHSP18*. En general, las condiciones de sequía inducen la expresión del gen *OpsHSP18*, siendo más notoria la expresión conforme avanza el periodo de estrés, en particular en el tratamiento de Luz-Sequía a los 45 días.

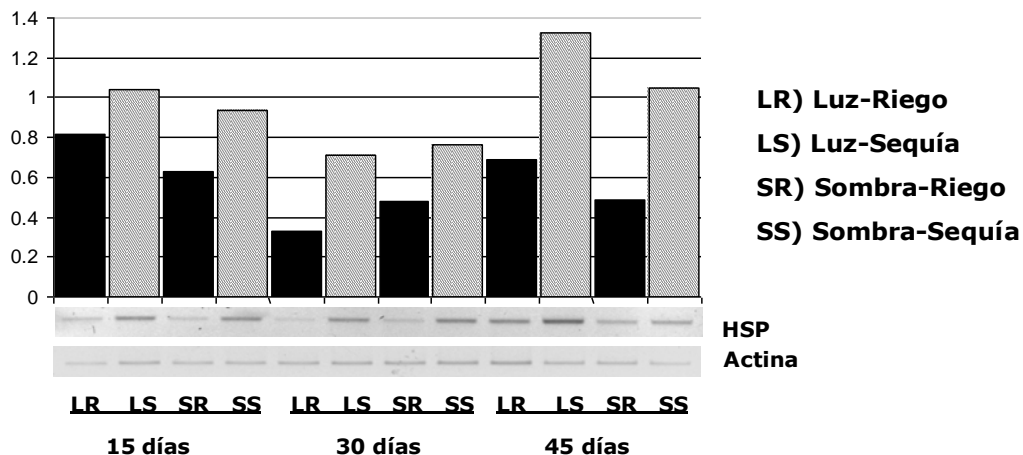


Figura 35. Análisis de la expresión del gen *OpsHSP18* de *Opuntia streptacantha* bajo condiciones de estrés abiótico. La expresión del gen *OpsHSP18* se midió bajo estrés hídrico incluyendo tratamientos de Luz-Riego (LR), Luz-Sequía (LS), Sombra-Riego (SR) y Sombra-Sequía (SS) durante 15, 30 y 45 días. La gráfica muestra la expresión relativa del gen *OpsHSP18* al ser normalizada con la expresión del gen de referencia (actina).

4.2.2 Sobreexpresión del gen *OpsHSP18* en *A. thaliana*

Con el objetivo de caracterizar el gen *OpsHSP18* de nopal se construyó un vector para su sobreexpresión en *A. thaliana*. Primero se realizó la amplificación utilizando de molde el cDNA de la biblioteca de nopal con los oligonucleótidos G (tabla 5) diseñados en el ORF. En la figura 36, se muestra la banda de la amplificación del ORF del gen *OpsHSP18*, con un tamaño de 492 pb. Después de la amplificación, se clonó en el vector pEntry para su transformación en *E. coli*.

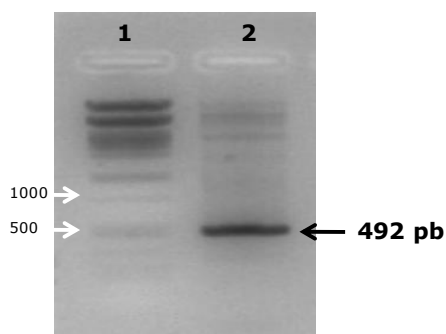


Figura 36. Amplificación del ORF del gen *OpsHSP18* a partir de cDNA. Amplificación del ORF del gen *OpsHSP18* a partir de cDNA. El marcador de peso molecular (carril 1) y la banda 492 pb correspondiente al ORF del gen *OpsHSP18* (carril 2).

Posteriormente, mediante PCR en colonia se verificó la amplificación del ORF del gen *OpsHSP18* en *E. coli*. Al seleccionar 20 colonias al azar, fue obtenida la amplificación del fragmento esperado de 492 pb (Fig. 37A). A partir de estas colonias, se seleccionaron 8, mediante PCR se verificó la orientación del gen *OpsHSP18* en el vector pEntry, utilizando el oligo GW1 (I; tabla 5) el cual está ubicado a 77 pb donde se clona el producto de PCR y con el oligo antisentido del gen *OpsHSP18* (Fig. 37B). En la figura 35C, se muestra la amplificación del ORF del gen *OpsHSP18* en los carriles 4, 6 y 7, con un tamaño de 569 pb. El plásmido pEntry-*OpsHSP18* (clona 3) fue secuenciado y seleccionado para recombinarlo al vector destino pMDC32.

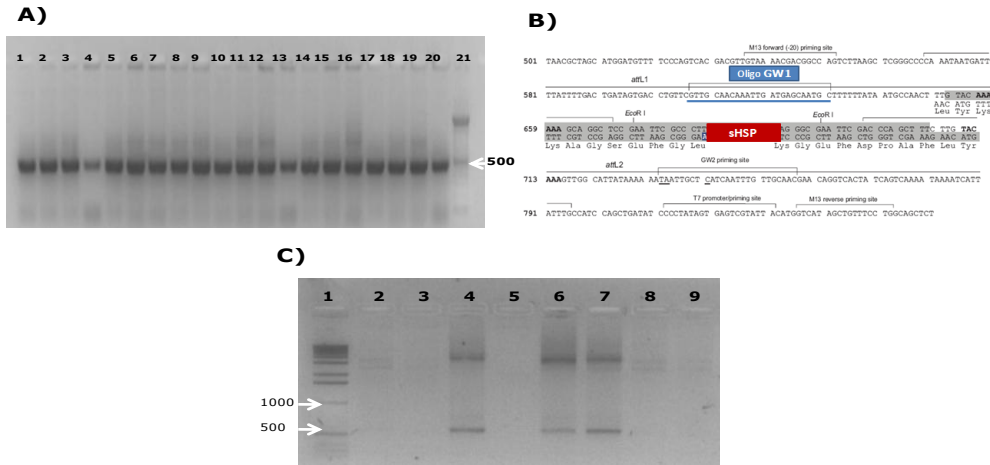


Figura 37. Análisis del gen *OpsHSP18* en el vector pEntry en *E. coli*. A) PCR de 20 colonias del gen *OpsHSP18* en células de *E. coli* (carriles 1-20) y el marcador de peso molecular (carril 21). B) Esquema donde se representa el oligo GW1 (línea azul) ubicado a 77 pb del producto de clonación (cuadro rojo) en el vector pEntry. C) PCR para verificar la orientación del gen *OpsHSP18* en el vector pEntry (carriles 2-9) y el marcador de peso molecular (carril 1).

Después de la recombinación del vector pEntry-*OpsHSP18* al vector pMDC32 mediante la clonasa LR, el producto de la recombinación se transformó en células de *E. coli*, las cuales se seleccionaron en medio LB con kanamicina. Posteriormente, para verificar la integración del gen *OpsHSP18* en el vector pMDC32, se realizó mediante PCR de colonia (15 colonias seleccionadas al azar) con los oligonucleótidos G (tabla 5). En la figura 38, se muestra la amplificación del ORF *OpsHSP18* con un tamaño de 492 pb. El plásmido pMDC32-*OpsHsp18* (clona 1) se seleccionó para la transformación genética de *A. tumefaciens*.

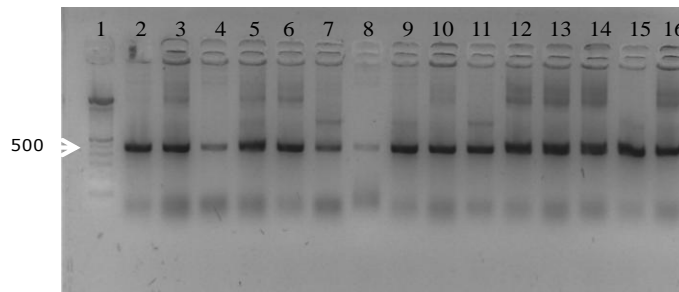


Figura 38. PCR de colonia del ORF del gen *OpsHSP18* en el vector pMDC32 en *E. coli*. Amplificación del ORF del gen *OpsHSP18* en el vector pMDC32 de 15 colonias (carriles 2-16), el tamaño de la banda es de 492 pb en *E. coli* y el marcador de peso molecular (carril 1).

Para efectuar el escrutinio de las células transformadas de *A. tumefaciens* que contengan el plásmido pDCM32-*OpsHSP18* se utilizaron placas de LB con una combinación de antibióticos (rifampicina y ampicilina que son los marcadores de resistencia para la bacteria, y kanamicina que es el marcador de resistencia del vector pMDC32). Además se verificó por medio de PCR la banda correspondiente a 492 pb del gen *OpsHSP18*. En la figura 39, se corrobora la amplificación del gen *OpsHSP18* en el vector pMDC32 (pMDC32-*OpsHSP18*).

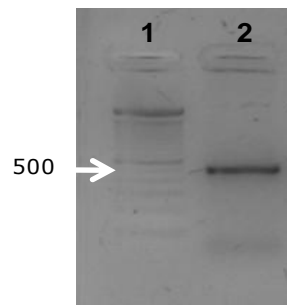


Figura 39. PCR de colonia del gen *OpsHSP18* en el vector pMDC32 en *A. tumefaciens*. PCR de colonia del gen *OpsHSP18* que presentan un tamaño de banda de 492 pb (carril 2) y el marcador de peso molecular (carril 1).

El plásmido pMDC32-*OpsHSP18* se transformó en *A. thaliana*. Después de obtener semillas transgénicas de *Arabidopsis*, se seleccionaron en medio MS con higromicina. A partir de esta selección de la primera generación filial 1 (F1), se obtuvieron once líneas transformantes resistentes al antibiótico. Posteriormente, el DNA genómico de las once líneas transformantes, fue extraído para verificar por PCR que amplifiquen el ORF del gen *OpsHSP18*. En la figura 40, se observa la banda de 492 pb en las once plantas transformantes, logrando así una transformación exitosa.

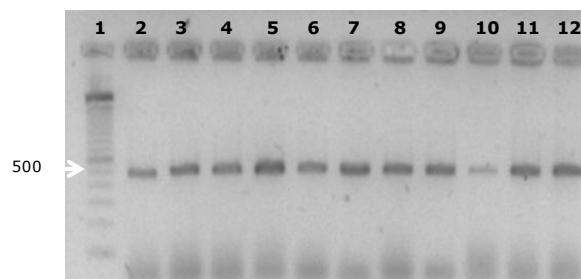


Figura 40. PCR de las líneas transgénicas del gen *OpsHSP18* en *A. thaliana*. Las once plántulas transformadas presentan el gen *OpsHSP18* con un tamaño de banda de 492 pb (carriles 2-12) y el marcador de peso molecular (carril 1).

Además, de la prueba de PCR genómico, se realizó un RT-PCR punto final de las once líneas transformantes, para conocer el nivel aproximado de expresión de cada línea transgénica. A partir del cDNA de las once líneas se realizó el PCR con los oligonucleótidos G (tabla 5) para amplificar el ORF del gen *OpsHSP18*, y como control utilizamos oligonucleótidos J (tabla 5) para amplificar el gen de actina de *Arabidopsis* como gen de referencia (Fig. 41A). En la figura 41B, se muestra la gráfica de los valores normalizados de la expresión del gen con respecto a la expresión de actinas. La selección de las líneas transgénicas fue al azar, seleccionando las líneas transformantes 3 y 7 (flecha negra), las cuales se sometieron a condiciones de estrés salino.

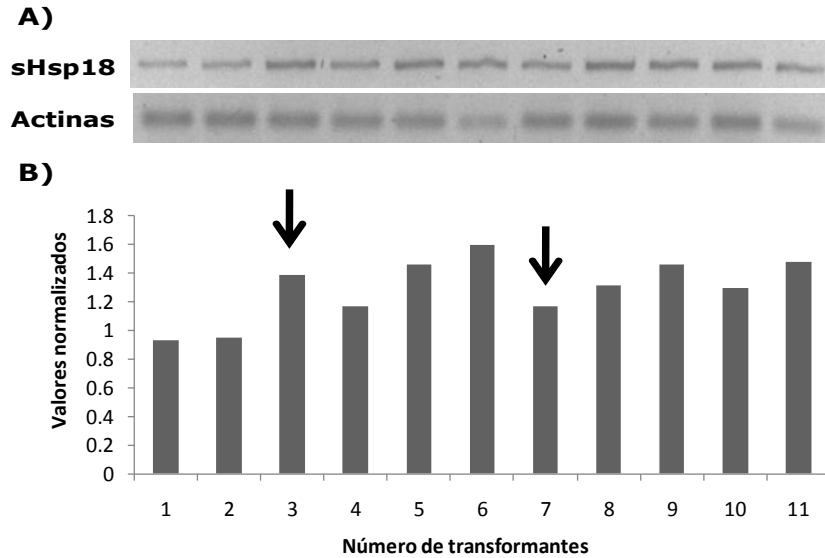


Figura 41. Expresión de las líneas transgénicas del gen *OpsHSP18* en *A. thaliana*. A) RT-PCR punto final del gen *OpsHSP18* en las once líneas transformantes y como control el gen de actina. Las flechas indican las líneas seleccionadas. B) La gráfica representa los valores normalizados de la expresión del gen *OpsHsp18* respecto al control.

Actualmente, estamos identificando la línea homocigota estable del transgen en la segunda generación filial (F2) de las 2 líneas sobreexpresantes (*OpsHSP18-over3* y *OpsHSP18-over7*) para lograr líneas transgénicas estables.

4.2.3 Análisis del fenotipo de la sobreexpresante del gen *OpsHSP18* en *A. thaliana* bajo condiciones de estrés abiótico

Para analizar el fenotipo de las dos líneas sobreexpresantes *OpsHSP18-over3* y *OpsHSP18-over7* seleccionadas se realizaron experimentos bajo condiciones de estrés salino. El experimento se planteó de la siguiente forma: plántulas de 10 días de edad de las sobreexpresantes del gen *OpsHSP18* (*OpsHSP18-over3* y *OpsHSP18-over7*) y de la Col-0, se crecieron en placas MS a una concentración de 150 mM de NaCl durante 15 días. Después de este periodo de estrés salino, fueron transferidas a macetas con tierra para observar su recuperación post-estrés. En la figura 42, se muestra que las sobreexpresantes (*OpsHSP18-over3* y *OpsHSP18-over7*) se recuperan mejor y en un mayor

porcentaje con respecto a la Col-0. En la gráfica (Fig. 42), se indica el porcentaje de supervivencia después de haber sido retadas al estrés salino, resultando que ambas líneas sobreexpresante del gen *OpsHSP18* de nopal muestran hasta un 70% de supervivencia en comparación con la Col-0 que muestra menos del 20% de supervivencia.

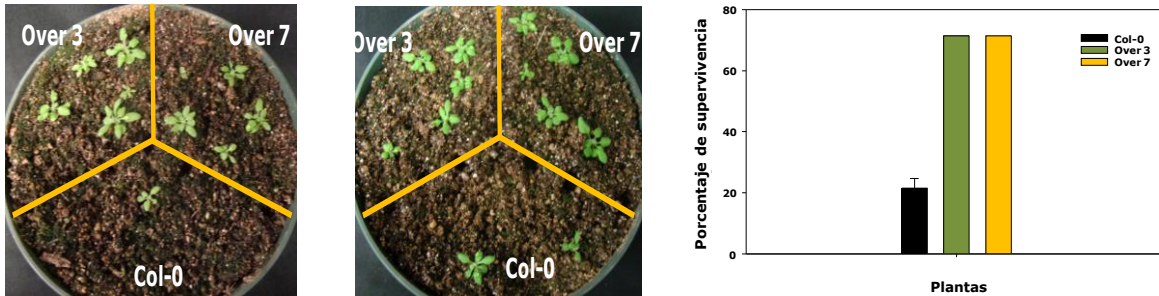


Figura 42. Análisis del fenotipo de las líneas sobreexpresantes del gen *OpsHSP18* de *A. thaliana* bajo condiciones de estrés abiótico. Imágenes de las líneas transgénicas sobreexpresantes *OpsHSP18* (*OpsHSP18-over 3* y *OpsHSP18-over 7*) y la Col-0 en recuperación, después de retarlas con 150 mM de estrés salino. En la gráfica se muestra el porcentaje de supervivencia de las sobreexpresantes *OpsHSP18-over 3* (barras verdes), *OpsHSP18-over 7* (barras amarillas) y la Col-0 (barra negras). En experimento se realizó por duplicado con 7 plántulas por tratamiento.

V. DISCUSIÓN

Las plantas son organismos sésiles, las cuales están diariamente expuestas a condiciones desfavorables, como por ejemplo temperaturas extremas, la falta de agua, diversos tipos de suelos no aptos, entre otros, los cuales limitan su crecimiento y desarrollo. Para contrarrestar todos estos estreses ya sea a corto ó a largo plazo, las plantas han desarrollado mecanismos de adaptación a dichos entornos complejos y cambiantes.

Uno de los fenómenos más comunes cuando la planta se ve afectada bajo condiciones de estrés es la pérdida de estructura e inactivación de las proteínas. Para ello, la planta cuenta con un sistema complejo de chaperonas moleculares como las proteínas de choque térmico (HSPs). Dichas HSPs se han clasificado de acuerdo con su peso molecular, y son esenciales para los procesos celulares, como la síntesis, el plegamiento, el replegamiento, la localización subcelular, el transporte y la prevención de agregados de proteínas (Mayer y Bukau, 2005). La inducción de las HSPs se ha descrito principalmente bajo condiciones de estrés por calor, sin embargo, se inducen bajo otras condiciones de estrés, como frío y salinidad (Noven *et al.*, 1992; Kilstrup *et al.*, 1997).

En el presente trabajo de tesis, nos enfocamos a la identificación de ESTs que codifican para proteínas de choque térmico, partiendo de bibliotecas de cDNA de frijol y nopal previamente generadas en nuestro grupo de trabajo bajo condiciones de estrés abiótico. De esta manera, a partir de una biblioteca sustractiva (SSH) de frijol, solo identificamos un EST que mostró homología con las DnaJ de plantas, y en el caso de nopal, identificamos un cDNA que mostró homología con las sHSP18 de plantas. El frijol y el nopal constituyen plantas de interés agronómico en nuestro país, sin embargo, las herramientas de biología molecular aún no han sido eficientemente desarrolladas para estas plantas. Por ello, se propuso la caracterización de genes ortólogos a las HSPs de frijol en *Arabidopsis*, así como la caracterización funcional del gen de nopal en ésta planta modelo. De esta manera,

en esta tesis nos enfocamos a estudiar los genes ortólogos de *A. thaliana* (*AtDJ2* y *AtDJ3*) al EST aislado en la SSH de frijol, el cual es una secuencia de cDNA parcial de 790 pb, que es homóloga a proteínas DnaJ de plantas. Esta secuencia parcial de frijol al ser traducida *in silico* codifica para 263 aa, que corresponden a la parte central de las proteínas DnaJ, sin embargo carece del dominio J (el cual está localizado hacia el amino terminal), y de la región C-terminal. Dicha proteína parcial de DnaJ de frijol (263 aa) presenta una identidad de 53.7 y 54.5% con las proteínas *AtDJ2* y *AtDJ3* de *Arabidopsis*, respectivamente. Las proteínas *AtDJ2* y *AtDJ3* pertenecen al tipo I o A de la familia de las DnaJ, las cuales presentan todos los dominios característicos como: el dominio J, la región rica en glicinas y fenilalaninas (G/F), el dominio dedo de zinc y la región carboxi-terminal.

Es importante señalar que entre estos genes parálogos, el *AtDJ2* y la versión larga del *AtDJ3.2* (resultado de una retención de intrón) presentan una alta identidad del 90.8% a nivel proteína. No obstante, la identidad disminuye al comparar la versión pequeña *AtDJ3.1* con las *AtDJ3.2* y *AtDJ2* que presentan identidades de 77.4% y 71.3%, respectivamente. Cabe mencionar que la región carboxi-terminal de las DnaJ de plantas se encuentra conservada, por lo que la versión *AtDJ3.1* al tener una región carboxilo terminal más corta (77 aa menos) podría tener un cambio en su estructura y así verse reflejado en sus posibles interacciones proteína-proteína, que la haga tiempo y tejido específico. A futuro será clave elucidar la posible función de esa región C-terminal en sus dos versiones.

Por otro lado, se ha reportado que en ciertos casos la expresión tejido específico, se debe al “splicing” alternativo de los transcritos de los DnaJ. Aunado a lo anterior, en humano se ha descrito una variante de procesamiento de la DnaJA1, la cual pertenece a la misma clase (tipo1) de las *AtDJ2* y *AtDJ3* de *Arabidopsis* (Hu et al., 2004). La versión DnaJA1 tiene un tamaño de 397 aa, en cambio la versión que sufre el procesamiento (nDnaJA1) mide solo 331 aa, debido a que el último intrón es retenido, y solo se traducen cinco aa del intrón (Hu et al., 2004). Esta versión de humano es interesante (nDnaJA1) debido a que coincide con la

versión AtDJ3.1 de Arabidopsis, ya que ambas presentan un carboxilo terminal más corto; siendo más específicos, la versión de Arabidopsis carece de 77 aa y la del humano de 66 aa del final de la proteína en comparación a sus isoformas respectivas. Otro punto notable, es que la versión que la DnaJA1 de humano es altamente expresada en testículos y pulmón, pero su expresión es baja en colon e hígado, mientras que la isoforma nDnaJA1 (versión pequeña) es altamente expresada en colon e hígado (Hu et al., 2004). Por lo que otro punto a considerar en nuestro trabajo, sería determinar si las isoformas de Arabidopsis se expresan tejido específico y/o en diversas condiciones de estrés.

Cuando obtuvimos las líneas mutantes insercionales de T-DNA de los genes *AtDJ2* y *AtDJ3* y la doble mutante (*atdj2-atdj3*) para determinar los fenotipos por pérdida de función obtuvimos un retraso en la velocidad de germinación bajo condiciones de estrés salino, principalmente con la mutante *atdj3* y en la doble mutante. Cabe mencionar que el efecto que se observó solo fue en la velocidad de germinación, y no fueron afectadas en la viabilidad de germinación. Lo anterior lo consideramos porque al continuar monitoreando los experimentos de germinación bajo salinidad por más de 10 días (20 días desde el inicio del estrés), observamos que todas las líneas mutantes alcanzaron el 100% de su tasa de germinación.

Respecto a la línea mutante sencilla *atdj3*, que presentó un retraso más pronunciado en la velocidad de germinación comparándola con la otra línea mutante *atdj2*, bajo condiciones de estrés y crecidas en MS, una posible explicación es que la expresión del gen *AtDJ3* reportada en diversos microarreglos es principalmente en las etapas de desarrollo de la semilla, por lo que dicha mutante al carecer de esta DnaJ puede estar afectada en el proceso de germinación, continuando así con la tendencia más marcada del retraso de germinación para la doble mutante.

En un reporte previo Li et al., (2007), estudiaron los genes At5g22060 y At3g44110 bajo condiciones de estrés por calor, reportando que sola la doble mutante (*atdj2-*

atdj3), mostró un fenotipo de sensibilidad a elevadas temperaturas en comparación a las líneas mutantes sencillas (*atdj2* y *atdj3*) y a la Col-0. El experimento consistió en someter plántulas de 10 días de edad de las líneas mutantes sencillas (*atdj2* y *atdj3*), la doble mutante (*atdj2-atdj3*) y la Col-0 a 45°C durante 100 min, y después del choque térmico se colocaron a 22°C por 7 días para observar su fenotipo en recuperación. En particular, el fenotipo de las mutantes sencillas no mostraron diferencias importantes en comparación con la Col-0, sin embargo en la doble mutante se observó un fenotipo de clorosis a los 7 días de recuperación (Li et al., 2007). Cabe señalar que en el trabajo del Dr. Li, coincidimos con la misma línea insercional de T-DNA (Salk_071563) para el gen At5g22060, pero para el gen At3g44110, nosotros trabajamos con la línea Salk_132923, que se localiza río arriba de la línea Salk_141625 con la cual ellos trabajaron. Ambas líneas presentan la inserción de T-DNA en la región del ORF, por lo que las dos líneas interrumpen la función de dicho gen.

En nuestro trabajo pudimos identificar un fenotipo más marcado en la mutante sencilla *atdj3* en germinación bajo condiciones de estrés salino, en comparación a los estudios realizados de estas mutantes por choque térmico por el grupo de Li et al., 2007. Aunado a lo anterior, los fenotipos de sensibilidad en el doble mutante tanto en estrés salino como térmico apoya la hipótesis de que ambos genes *AtDJ2* y *AtDJ3*, están implicados en respuesta a diversos tipos de estrés abiótico.

Otro de los objetivos que se plantearon, fue la construcción del vector destino pMDC32/AtDJ2 para la sobreexpresión del ORF del gen *AtDJ2* en *A. thaliana*, utilizando el promotor constitutivo 35S. Actualmente, estamos en la etapa de selección de las plantas transgénicas resistentes a higromicina. Una vez que se tengan las líneas sobreexpresantes, las someteremos a condiciones de estrés abiótico, en donde esperamos obtener plantas tolerantes bajo condiciones de estrés salino. Es importante mencionar, que en el trabajo del Dr. Li, generaron líneas sobreexpresantes de los dos DnaJ (*AtDJ2* y *AtDJ3*), las cuales muestran termotolerancia a 45°C durante 120 min, comparando con la Col-0.

En el reporte de Zhu et al (1993), describen la DnaJ (ANJ1) de *Atriplex nummularia* (una especie arbustiva forrajera de alta adaptabilidad a la aridez y semiaridez), la cual es homóloga a la DnaJ de *S. cerevisiae*. Demostraron que la pANJ1, presenta una homología funcional a YDJ1/IMAS5, porque fue capaz de complementar el fenotipo de crecimiento de sensibilidad a temperatura de la mutación de $\Delta ydj1/mas5$ en levadura. En este trabajo mostraron que hay una inducción coordinada de los transcritos tanto de la ANJ1 como de la Hsp70 durante el estrés térmico, sin embargo, sus patrones de expresión difieren bajo condiciones de NaCl, observando que la expresión de la ANJ1 se incrementa bajo condiciones de estrés salino, comparada con la Hsp70 que no se observa su expresión (Zhu et al., 1993).

Otra de las estrategias que se planteó para la caracterización de estas proteínas DnaJs, fue la construcción del vector “bait” con el gen At5g22060 (AtDJ2), para identificar proteínas blanco con el sistema de dos híbridos “split-ubiquitin” en *S. cerevisiae*. Hasta el momento existen pocos reportes acerca de los posibles ligandos de las proteínas de choque térmico. Por ejemplo, en el trabajo de Millson et al., (2004), reportaron las interacciones proteína-proteína de la chaperona molecular HSP90, describiendo interacciones entre sí y con otras proteínas distintas, tales como un activador del dominio ATPasa de las HSP90, factores de transcripción, proteínas que participan en la remodelación de la cromatina y proteínas de función desconocida, entre otras. Por lo tanto, pretendemos obtener e identificar a futuro utilizando el vector “bait” pDHB1AtDJ2 con el sistema de dos híbridos proteínas blanco o ligandos de la AtJD2 y que podrían incluir otras HSPs o proteínas relacionadas al estrés, las cuales nos ayudarían para entender el mecanismo de acción de las chaperonas moleculares.

Respecto a la proteína de choque térmico de bajo peso molecular OpsHSP18 que seleccionamos de nopal para ser estudiada en esta tesis, en los ensayos de ganancia de función en líneas transgénicas de *Arabidopsis* que sobreexpresan

ésta sHSP, observamos una tolerancia bajo estrés salino en comparación a la Col-0.

De esta manera, en otros trabajos sugieren que la sobreexpresión de sHSP puede proteger a la planta de los daños causados por el estrés abiótico. Recientemente, Sato y Yokoya (2008) muestran que la sobreexpresión de la sHsp17.7 de arroz incrementa la tolerancia a la sequía en plantas transgénicas de arroz. Por otro lado, Sun et al., (2001) demuestra que la sobreexpresión de AtHsp17.6 de *A. thaliana* confiere tolerancia al estrés por sequía y salinidad pero no al estrés por calor. Los resultados de estudios recientes sugieren que la producción de las sHSP correlaciona con la tolerancia al estrés.

A pesar de la importancia de las proteínas de choque térmico en la respuesta al estrés aún no se conoce completamente su mecanismo de acción. Aunado a esto, siendo estas proteínas chaperonas moleculares, uno de los puntos clave será el identificar sus posibles ligandos y/o proteínas blanco. Por lo tanto, las líneas mutantes, líneas transgénicas sobreexpresantes, los vectores construidos y los resultados obtenidos en este estudio, proporcionarán información relevante y contribuirán al entendimiento del mecanismo de acción de las proteínas de choque térmico.

VI. PERSPECTIVAS

Analizar el fenotipo de las líneas mutantes sencillas (*atdj2* y *atdj3*) y la doble mutante (*atdj2-atdj3-46*) bajo diferentes condiciones de estrés (calor y osmótico), tanto en las etapas de germinación como en plántulas.

Analizar el fenotipo de la sobreexpresante del gen *AtDJ2* en *A. thaliana* bajo diferentes condiciones de estrés (salino, calor, osmótico) tanto en las etapas de germinación como en plántulas.

Obtener e identificar posibles proteínas blanco de la proteína *AtDJ2* de *A. thaliana* utilizando el sistema de dos híbridos de la tecnología “split-ubiquitin”.

Clonar las dos versiones de los transcritos (*AtJD3.1* y *AtDJ3.2*) del gen *AtDj3*, para sobreexpresarlos en la mutante sencilla *atdj3* de *A. thaliana* para analizar su fenotipo bajo diferentes condiciones de estrés (salino, calor, osmótico) tanto en las etapas de germinación como en plántulas.

Analizar la sobreexpresante del gen *OpsHSP18* de nopal en *A. thaliana* bajo diferentes condiciones de estrés (calor y osmótico), tanto en las etapas de germinación como en plántulas.

VII. ANEXO

Medios de cultivos

Los medios utilizados en este estudio, se prepararon con agua destilada, y se esterilizaron por autoclave.

Medio de cultivo Luria Bertani (LB; Un litro):

1) Líquido

- 10 g de pectona
- 5 g de extracto de levadura
- 10 g de NaCl ajustar a pH de 7.5 con NaOH

Medio de cultivo Luria Bertani (LB; Un litro):

2) Sólido

- 10 g de pectona
- 5 g de extracto de levadura
- 10 g de NaCl ajustar a pH de 7.5 con NaOH
- 10 g de agar microbiológico

Medio de Cultivo Murashige y Skoog (MS)

1) Por cada litro:

- 4.33 gr de MS
- 30 gr de sacarosa
- 14 gr de agar

2) MS al 50% para poner a germinar semillas por litro

- 2.165 gr de MS
- 15 gr de sacarosa
- 14 gr de agar

En algunos casos fue necesario agregarles antibióticos, los cuales son:

- Espectinomicina 50 µg/mL
- Kanamicina 50 µg/mL
- Ampicilina 50 µg/mL
- Rifampicina 50 µg/mL
- Higromicina 50 µg/mL

Los medios utilizados en los experimentos bajo condiciones de estrés abiótico se prepararon de la siguiente manera: los gramos de NaCl o manitol se pesaron dependiendo de la concentración utilizada en este estudio fueron 75, 100, 125, 150 mM, y 150, 200 250 mM, respectivamente, antes de esterilizar por autoclave se agregó junto con los ingredientes para el medio MS.

Soluciones

Solución Birnboim I (Minipreps) (100 ml):

- 50 mM glucosa (0.99 gr)
- 25 mM Tris-HCl pH 8 (2 ml de un Stock 2 M)
- 10 mM EDTA pH 8 (2 ml de un Stock 0.5 M)
- Aforar con agua a un volumen final de 100 ml

Solución Birnboim II (Minipreps) (10 ml):

- 0.2 N de NaOH (1 ml de un Stock 2 N)
- 1 % de SDS (0.5 ml de un Stock 20 %)
- Aforar con agua a un volumen final de 10 ml

Solución Birnboim III (Minipreps) (100 ml):

- Acetato de potasio (60 ml de un Stock 5 M)
- 11.5 ml de Ácido Acético Glacial
- 10 mM EDTA pH 8 (2 ml de un Stock 0.5 M)
- Aforar con agua a un volumen final de 100 ml

CTAB para la extracción de DNA genómico:

- 2% (W/V) de CTAB
- 1.4 M de NaCl
- 100 mM de Tris HCl con un pH de 8.0
- 20 mM de EDTA

Esterilizo por autoclave y se cubre con aluminio para protegerlo de la luz.

Solución para la transformación de *Arabidopsis thaliana* (100 mL):

- 0.22 g de Murashige y Skoog (MS)
- 5 g de sacarosa pura al 5%
- 50 µl de Silwet L-77

Resuspender la pastilla de células de *Agrobacterium tumefaciens*

Geles de agarosa

Gel de Agarosa 1.2 % ó 0.8 % para DNA (electroforesis; 100 ml):

- 1.2 ó 0.8 gr de agarosa respectivamente.
- 100 ml de TAE 1X
- Después de disolver en el microondas se agrega 40 µl de Bromuro de Etídio

Geles de Agarosa para RNA (electroforesis; 37.5 ml):

- 0.65 gr de agarosa
- 37.5 ml de agua DPC,
- 8.5 ml de formaldehido
- 5 ml de MOPS 10X

Proceso de las muestras de RNA (8.5 µl):

- 2 µl de RNA,
- 6 µl de buffer de carga

Incuba en baño maría durante 5 minutos a 65°C,

- 0.5 de bromuro de etidio

Reposó a 4°C durante 2 minutos

VIII. REFERENCIAS

- Adams, M. D., Celniker, S. E., Holt, R. A., Evans, C. A., Gocayne, J. D., Amanatides, P. G., *et al.* 2000. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287: 2185–2195.
- Banzet, N., Richaud, C., Deveaux, Y., Kazmaier, M., Gagnon, J. and Triantaphylides, C. 1998. Accumulation of small heat shock proteins, including mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. *Plant J.* 13: 519–527.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6):1513–1523.
- Boston, R. S., Viitanen, P. V. and Vierling, E. 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Mol. Biol.* 32(1-2): 191–222.
- Bray, E. A., Bailey-Serres, J. and Weretilnyk, E. 2000. Responses to abiotic stresses. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. W Gruissem, B Buchanan, R Jones, (eds.) American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp. 1158–1249.
- Brunold, C., Rügsegger, A. and Brändle, R. 1996. Stress bei Pflanzar. *Ökologie Physiologie Biochemie Molekularbiologie*. 407p.
- Buchner, J. 1996. Supervising the fold: Functional principles of molecular chaperones. *FASEB J.* 10: 10–19.
- Bukau, B., and Horwich, A. L. 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell Press.* 92: 351–366.
- Carver, J. A., Esposito, G., Schwedersky, G. and Gaestel, M. 1995. ¹H NMR spectroscopy reveals that mouse Hsp25 has a flexible C-terminal extension of 18 amino acids. *FEBS Lett.* 369(2-3): 305–310.
- Carver, J. A., Rekas, A., Thorn, D. C. and Wilson, M. R. 2003. Small heat-shock proteins and clusterin: intra- and extracellular molecular chaperones with a common mechanism of action and function. *Fac. Sci.* 1–14.

- Caspers, G. J., Leunissen, J. A. M. and de Jong, W. W. 1995. The expanding small heat-shock protein family, and structure predictions of the conserved α -crystallin domain'. J. Mol. Evol. 40: 238–248.
- Chang, Z., Primm, T. P., Jakana, J., Lee, I. H., Serysheva, I., Chiu, W., et al. 1996. *Mycobacterium tuberculosis* 16-kDa antigen (Hsp16.3) functions as an oligomeric structure *in vitro* to suppress thermal aggregation. J. Biol. Chem. 271: 7218–7223.
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J. and Kim, S. Y. 2000. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. J. Biol. Chem. 275(3): 1723–1730.
- Curtis, M. D. and Grossniklaus, U. 2003. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. Plant Physiol. 133: 462–469.
- Cushman, J. C. and Bohnert, H. J. 2000. Genomic approaches to plant stress tolerance. Curr. Opin. Plant Biol. 3: 117–124.
- Ehrnsperger, M., Lilie, H., Gaestel, M. and Buchner, J. 1999. The dynamics of Hsp25 quaternary structure—structure and function of different oligomeric species. J. Biol. Chem. 274: 14867–14874.
- Estrella, V. R., Barkla, B. J., Bohnert, H. J. and Pantoja, O. 2004. Novel regulation of aquaporins during osmotic stress. Plant Physiol. 135: 2318–2329.
- Feder, M. E. and Hoffman, G. E. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annu. Rev. Physiol. 61: 243–282.
- Finnzymes' Oy Phusion®, 2009. High-Fidelity PCR Master Mix. Tools for Molecular Biology. Disponible en: www.finnzymes.com. Accesado: 17/04/2009.
- Harrington, H. M. and Alm, D. M. 1988. Interaction of heat and salt shock in cultured tobacco cells. Plant Physiol. 88: 618–625.
- Harrison, S. J., Mott, E. K., Parsley, K., Aspinall, S., Gray, J. C. and Cottage, A. 2006. A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. Plant Methods. 2:19. Doi: 10.1186/1746-4811-2-19.

- Haslbeck, M., Walke, S., Stromer, T., Ehrnsperger, M., White, H. E., Chen, H. R., Saibil, S. X. and Buchner, J. 1999. Hsp26: a temperature-regulated chaperone. *EMBO J.* 18: 6744–6751.
- Hirt, H. and Shinozaki, K. 2003. Plant responses to abiotic stress. *Top. Curr. Gen.* 4: 73–101.
- HotStarTaq® PCR Handbook, 2008. QIAGEN Sample and Assay Technologies. Disponible en: www.qiagen.com. Accesado: 17/04/2009. 42p.
- Hu, Y., Zhou, Z., Huang, X., Xu, M., Lu, L., Xu, Z., Li, J. and Sha, J. 2004. Expression of a novel DnaJA1 alternative splicing in human testis and sperm. *Int. J. Androl.* 27(6): 343–349.
- Iba, K. 2002. Acclimative response to temperature stress in higher plants: approaches of gene engineering for temperature tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 225–245.
- Invitrogen™ 2006. pCR^R8/GW/TOPO^RTA Cloning^R Kit: Five-minute, TOPO^R Cloning of Taq polymerase-amplified PCR into an entry vector for the Gateway^R System. Catalog No. K2500-20, K2520-20, and K2520-02. User Manual. Version E. 32p.
- Invitrogen™. 2001. Concert™ Plant RNA Reagent. Small Scale RNA Isolation. Catalog No. 12322-012, pp. 4-5.
- Invitrogen™. 2003. SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR. Catalog no. 11904-018. Version E. 26p.
- Invitrogen™. 2004a. Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix. Catalog No. 11791-020 and 11791-100. 4p.
- Invitrogen™. 2004b. One Shot® TOP10 Competent Cells. Catalog No(s). C4040-10, C4040-03, C4040-06, C4040-50, and C4040-52. Version M. 11p.
- IPCC, 1996: The Science of Climate Change. In: *Climate Change 1996: Contribution of Working Group I to the Second Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Houghton, J. T., L. G. Meira Filho, B. A. Callander, N. Harris, A. Kattenberg, and K. Maskell (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

- IPCC, 2007: Summary for Policymakers. In: 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., Qin, M. Manning, Z. Zen, M. Marquis, K. B. Avery, M. Tignor and H. L. Miller (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, N. Y., USA.
- Khanna-Chopra, R. and Sinha, S. K. 1998. Prospects of success of biotechnology approaches for improving tolerance to drought stress in crop plants. *Curr. Sci.* 74: 25–34.
- Kilstrup, M., Jacobsen, S., Hammer, K. and Vogensen, F. K. 1997. Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1826–1837.
- Knight, H. and Knight, M. R. 2001. Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* 6: 262–267.
- Laufen, T., Mayer, M. P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J. and Bukau, B. 1999. Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *PNAS* 96(10): 5452–5457.
- Lee, G. J. and Vierling, E. 2000. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol.* 122: 189–198.
- Lee, G. J., Pokala, N. and E. Vierling, E. 1995. Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea*. *J. Biol. Chem.* 270(18): 10432-10438.
- Leroux, M. R., Melki, R., Gordon, B., Batelier, G. and Candido, P. M. 1997. Structure-function studies on small heat shock protein oligomeric assembly and interaction with unfolded polypeptides. *J. Biol. Chem.* 272(39): 24646–24656.
- Li, G. L., Chang, H., Li, B., Zhou, W., Sun, D. Y. and Zhou, R. G. 2007. The roles of the atDjA2 and atDjA3 molecular chaperone proteins in improving thermotolerance of *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Sci.* 173: 408–416.

- Liu, Q., Zhao, N., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2000. Regulatory role of DREB transcription factors in plant drought, salt and cold tolerance. *Chinese Sci. Bull.* 45: 970–975.
- Mayer, M. P. and Bukau, B. 2005. Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol. Life Sci.* 62: 670–684.
- Miernyk, J. A. 2001. The J-domain proteins of *Arabidopsis thaliana*: an unexpectedly large and diverse family of chaperones. *Cell Stress Chaperon.* 6(3): 209–218.
- Millson, S. H., Truman, A. W., Wolfram, F., King, V., Panaretou, B., Prodromou, C., Pearl, L. H. and Piper, P. W. 2004. Investigating the protein-protein interactions of the yeast Hsp90 chaperone system by two-hybrid analysis: potential uses and limitations of this approach. *Cell Stress Chaperon.* 9(4): 359–368.
- Mittler, R. and Suzuki, N. 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: A delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plantarum* 126: 45–51.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. and Van Breusegem, F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.* 9: 490–498.
- Narberhaus, F. 2002. α -Crystallin-type heat shock proteins: socializing minichaperones in the context of a multichaperone network. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66(1): 64–93.
- Nollen, E. A. and Morimoto, R. I. 2002. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing ‘heat shock’ proteins, *J. Cell Sci.* 115: 2809–2816.
- Noven, L. G., Haskell, D. W., Guy, C. L., Denslow, N., Klein, P. A. Green, L. G. and Silverman, A. 1992. Association of 70-kilodalton heat-shock cognate proteins with acclimation to cold. *Plant Physiol.* 99: 1362–1369.
- Promega. 2009. Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System. Catalog No. A9281. pp. 34.
- Prändl, R., Hinderhofer, K., Eggers-Schumacher, G. and Schöffl F. 1998. HSF3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, derepresses the heat shock

- response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. *Mol. Genet. Genetics*. 258: 269–278.
- Rao, K. V. M. 2006. Introduction. In: *Physiology and Molecular Biology of Stress Tolerante in Plants*. K. V. Madhava Rao, A. S. Raghavendra and K. Janardhan Reddy. (Eds.), Springer. The Netherlands. Chap. 1, Pp. 1-14.
- Sairam, R. K. and Tyagi, A. 2004. Physiology and molecular biology of salinity stress tolerance in plants. *Curr. Sci.* 86: 407–421.
- Sato, Y. and Yokoya, S. 2008. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Rep.* 27: 329–334.
- Scharf, K-D., Siddique, M. and Vierling, E. 2001. The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing α -crystallin domains (Acd proteins). *Cell Stress Chaperon.* 6: 225-237.
- Schöffl, F., Prändl, R. and Reindl, A. 1998. Regulation of heat-shock response. *Plant Physiol.* 117: 1135–1141.
- Sebehat A., Weiss D. and Lurie S. 1996. The correlation between heat shock protein accumulation and persistence and chilling tolerance in tomato fruits. *Plant Physiol.* 110: 531–537.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3: 217–223.
- Smirnoff, N. 1998. Plant resistance to environmental stress. *Curr. Opin. Biotechnol.* 9: 214–219.
- Sun, W., Bernard, C., Cotte, B. V., Montagu, M. V. and Verbruggen, N. 2001. At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression. *Plant J.* 27: 407–415.
- Sung, D-Y., Kaplan, F., Lee, K-J. and Guy, C. L. 2003. Acquired tolerance to temperature extremes. *Trends Plant Sci.* 8(4): 179–187.

- Suzuki, N. and Mittler, R. 2006. Reactive oxygen species and temperature stresses: a delicate balance between signaling and destruction. *Physiol. Plant.* 126: 45–51.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408(6814): 796–815.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium. 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282: 2012–2046.
- Thomashow, M. F. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 571–599.
- Vierling, E. 1991. The roles of heat shock proteins in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 579–620.
- Vierling, E. and Kimpel, J. A. 1992. Plant responses to environmental stress. *Curr. Opin. Biotechnol.* 3: 164–170.
- Vierling, E., Jaya, N. and García, V. 2009. Substrate binding site flexibility of the small heat shock protein molecular chaperones. *PNAS.* 106: 15604–15609.
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M. and Foolad, M. R. 2007. Heat tolerance in plants: An overview. *Environ. Exp. Bot.* 61: 199–223.
- Walsh, P., Bursac, D., Law, Y. C., Cyr, D. and Lithgow, T. 2004. The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO J.* 5(6): 567–571.
- Wang, W. X., Vinocur, B., Shoseyov, O. and Altman, A. 2001. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. *Acta Hort.* 560: 285–292.
- Wang, W., Vinocur, B. and Altman, A. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1–14.
- Wang, W., Vinocur, B. Shoseyov, O. and Altman, A. 2004. Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9(5): 244–252.

- Wang, Z. Q., Yuan, Y. Z., Ou, J. Q., Lin, Q. H., and Zhang, C. F. 2007. Glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase contribute differentially to proline accumulation in leaves of wheat (*Triticum aestivum*) seedlings exposed to different salinity. *J. Plant Physiol.* 164: 695–701.
- Waters E.R., Lee, G. J. and Vierling, E. 1996. Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *J. Exp. Bot.* 47: 325–338.
- Wehmeyer, N. and Vierling, E. 2000. The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggests a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiol.* 122: 1099–1108.
- Yan, W. and Craig, E. A. 1999. The glycine-phenylalanine-rich region determines the specificity of the yeast Hsp40 Sis1. *Mol. Cell. Biol.* 19: 7751–7758.
- Yeh, K. W., Jinn, T. L., Yeh, C. H., Chen, Y. M., and Lin, C. Y. 1994. Plant low-molecular-mass heat-shock proteins: their relationship to the acquisition of thermotolerance in plants. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 19: 41–49.
- Zhang, X., Henriques, R., Lin, S. S., Niu, Q. W. and Chua, N. H. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat. Prot.* 1(2): 641–646.
- Zhu, J. K. 2001. Plant salt tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 66–71.
- Zhu, J. K. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53: 247–273.
- Zhu, J-K., Shi, J., Bressan, R. A. and Hasegawa, P M. 1993. Expression of an *Atriplex nummularia* gene encoding a protein homologous to the bacterial molecular chaperone DnaJ. *Plant Cell.* 5: 341–349.