

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 el factor de cambio de nucleótido (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 | 36 |

| | |
|--|----|
| sustractiva de frijol con DnaJ de <i>Arabidopsis thaliana</i> | |
| 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- <i>AtDJ2</i>) 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 |

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 d, 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.