

**EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE ESTRÉS DE BAJO
PESO MOLECULAR (sHSPs) EN MESOCARPIO DE
CHIRIMOYA (*Annona cherimola* Mill.)**



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 2
Facultad de Farmacia
Universidad de Granada

Laura Sevillano Tripero
Granada, 2007

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS DE ESTRÉS DE BAJO PESO MOLECULAR (sHSPs) EN MESOCARPIO DE CHIRIMOYA (*Annona cherimola* Mill.)

Memoria presentada para aspirar al grado de Doctor en Farmacia por la Licenciada Laura Sevillano Tripero. Dirigida por los Doctores Alberto M. Vargas Morales y María del Mar Sola Zapata.

Directores:

Alberto M. Vargas Morales
Catedrático de la Universidad
de Granada

María del Mar Sola Zapata
Profesora Titular de la Universidad
de Granada

Esta Memoria ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 2 de la Universidad de Granada. Laura Sevillano ha disfrutado de una Beca del Programa Nacional de Formación del Profesorado Universitario del Ministerio de Educación y Ciencia. Los gastos experimentales derivados de la misma han sido sufragados por el Proyecto de la C.I.C.Y.T. AGL2000-1425 y por las ayudas de la Junta de Andalucía al grupo de investigación CVI 212.

Parte de los resultados que se recogen en esta Tesis Doctoral han sido presentados en el XXV, XXVI, XXVII y XXIX Congreso de la Sociedad Española de Bioquímica y Biología Molecular.

ABREVIATURAS

- ACD: dominio α - cristalino.
- AHA: motivo rico en aminoácidos aromáticos, hidrofóbicos y ácidos.
- Ap: Ampicilina.
- APS: persulfato amónico.
- ATBFs: factores de unión a secuencias ricas en AT.
- ATP: adenosina trifosfato.
- BSA: albúmina de suero bovino.
- C/EBPs: proteínas de unión al potenciador CCAAT.
- CCH: heterocomplejo de chaperonas citoplasmáticas.
- CHAPS: (3-[(3-Cholamidopropil) dimetilamonio]-1-propano-sulfonato).
- Clp: proteasa caseinolítica.
- CS: citrato sintasa.
- CTAD: dominio de activación.
- DO: densidad óptica.
- dATP: desoxi adenosina trifosfato.
- DBD: dominio de unión a DNA.
- dCTP: desoxi citosina trifosfato.
- DEPC: dietil pirocarbonato.
- dGTP: desoxi guanosina trifosfato.
- DNA: ácido desoxiribonucleico.
- DTT: ditioneitol.
- dTTP: desoxi timidina trifosfato.
- EDTA: ácido etilen diamino tetracético.
- G6PDH: glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.

- GUS: β -glucuronidasa.
- Hap: proteína asociada a HSP 70.
- Hip: proteína que interacciona con HSP 70.
- HK: hexokinasa.
- Hop: proteína organizadora de HSP 70 y HSP 90.
- HSC: proteína de choque térmico constitutiva.
- HSE: elemento de respuesta al choque térmico.
- HSF: factor de transcripción de choque térmico.
- HSG: gránulo de choque térmico.
- HSP: proteína de choque térmico.
- IEF: isoelectroenfoque.
- IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.
- kD: kilodalton.
- Km: Kanamicina.
- LB: medio Luria-Bertani.
- LDH: lactato deshidrogenasa.
- M: molar.
- MALDI-TOF: desorción/ionización mediante láser asistida por matriz-tiempo de vuelo.
- MDa: megadalton.
- MRE: elemento de respuesta a metales.
- mRNA: RNA mensajero.
- MS: espectrometría de masas.
- NADP⁺: nicotiamida adenina dinucleotido fosfato.
- NADPH: nicotiamida adenina dinucleotido fosfato reducido.
- NBD: dominio de unión a nucleótidos.
- NLS: dominio de localización nuclear.

- PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida.
- PGI: fosfoglucoasa isomerasa.
- pI: punto isoeléctrico.
- PMSF: fenil metil sulfonil fluoruro.
- PVDF: fluoruro de polivinilideno.
- PVPP: polivinilpolipirrolidona.
- r.p.m.: revoluciones por minuto.
- RACE: amplificación rápida de extremos de cDNA.
- RNA: ácido ribonucleico.
- SDS: dodecil sulfato sódico.
- sHSP: proteína de choque térmico de bajo peso molecular.
- SST: sólidos solubles totales.
- TAE: tampón tris/acético/EDTA.
- TBP: factor de unión a la caja TATA.
- TBS: tampón tris salino.
- Tc: Tetraciclina.
- TE: tampón tris/EDTA.
- TEMED: N, N, N', N'- tetrametil-etilendiamina.
- TGS: tampón tris/glicina/SDS.
- TPR: repeticiones de tetratricopéptidos.
- UFC: unidades formadoras de colonias.
- UV: ultravioleta.
- V: voltios.
- X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Maduración del fruto del chirimoyo

I.2. Efecto de la temperatura sobre la maduración

I.3. Daños por frío

I.3.1. Síntomas de daños por frío

I.3.2. Susceptibilidad a los daños por frío

I.4. Proteínas de choque térmico

I.4.1. HSP 100

I.4.1.1. Estructura

I.4.1.2. Función

I.4.2. HSP 90

I.4.2.1. Estructura

I.4.2.2. Función

I.4.3. HSP 70

I.4.3.1. Estructura

I.4.3.2. Función

I.4.4. HSP 60

I.4.4.1. Estructura

I.4.4.2. Función

I.4.5. Small HSPs (sHSPs)

I.4.5.1. sHSPs de plantas: clases y estructura.

I.4.5.2. Síntesis de sHSPs en plantas

I.4.5.2.1. Síntesis de sHSPs en situaciones de estrés

I.4.5.2.2. Síntesis de sHSPs en ausencia de estrés

I.4.5.3. Regulación de la expresión de sHSPs

I.4.5.4. Función de las sHSPs

II. OBJETIVOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. Materiales

III.2. Métodos

III.2.1. Tratamientos de los frutos y estudio de la maduración

III.2.1.1. Frutos

III.2.1.2. Tratamiento de los frutos

III.2.1.3. Preparación de mesocarpio para extractos

III.2.1.4. Determinación del contenido total de sólidos solubles

III.2.1.5. Determinación del pH en el mesocarpio

III.2.1.6. Determinación de la concentración de glucosa de fructosa en mesocarpio

III.2.1.6.1. Preparación de extractos perclóricos

III.2.1.6.2. Determinación de la concentración de glucosa

III.2.1.6.3. Determinación de la concentración de fructosa

III.2.1.6.4. Cálculos

III.2.2. Métodos para el estudio de proteínas de estrés

III.2.2.1. Obtención de extractos de mesocarpio para electroforesis

III.2.2.2. Preparación de muestras para electroforesis

III.2.2.3. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

III.2.2.4. Electroforesis bidimensional

III.2.2.5. Tinción con azul Coomassie

III.2.2.6. Tinción con plata

III.2.2.7. Transferencia de proteínas a membrana e inmunodetección

III.2.2.8. Preparación de muestras para MALDI-TOF MS

- III.2.2.9. Identificación de proteínas con MALDI-TOF MS
- III.2.2.10. Marcaje de proteínas con [³⁵S]-metionina
- III.2.2.11. Cuantificación de la concentración de proteínas
- III.2.3. Clonación de genes de estrés
 - III.2.3.1. Extracción de RNA
 - III.2.3.2. Cuantificación de RNA
 - III.2.3.3. Electroforesis de RNA
 - III.2.3.4. Retrotranscripción (RT)
 - III.2.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
 - III.2.3.6. 5' RACE (Rapid amplification cDNA ends)
 - III.2.3.7. Electroforesis de DNA
 - III.2.3.8. Digestión con enzimas de restricción
 - III.2.3.9. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa
 - III.2.3.10. Vectores de clonación
 - III.2.3.11. Ligación
 - III.2.3.12. Cultivos bacterianos
 - III.2.3.13. Preparación de células competentes
 - III.2.3.14. Transformación
 - III.2.3.15. Extracción de DNA plasmídico
 - III.2.3.15.1. Método de la lisis alcalina
 - III.2.3.15.2. Método GFX™ Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences)
 - III.2.3.16. Secuenciación
- III.2.4. Expresión heteróloga en bacterias
- III.2.5. Tratamientos de estrés en bacterias
 - III.2.5.1. Estrés térmico

III.2.5.1.1. Análisis de la estabilidad termal de las proteínas de *Escherichia coli*

III.2.5.1.2. Estudios de viabilidad

III.2.5.2. Estrés oxidativo

III.2.5.3. Estrés salino

III.2.6. Transformación de plantas

III.2.6.1. Vectores de transformación en plantas

III.2.6.2. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

III.2.6.3. Esterilización y germinación de semillas

III.2.6.4. Transformación de plantas de tabaco

IV. RESULTADOS

IV.1. Efecto de los tratamientos sobre la maduración de los frutos de chirimoyo

IV.1.1. Efecto sobre el aspecto externo e interno de los frutos

IV.1.2. Efecto sobre la concentración de sólidos solubles totales en mesocarpio

IV.1.3. Efecto sobre el pH de mesocarpio

IV.1.4. Efecto sobre la concentración de azúcares en mesocarpio

IV.2. Inducción de proteínas en mesocarpio de chirimoya por tratamientos con CO₂

IV.3. Marcaje con [35S]-metionina de proteínas de nueva síntesis inducidas por tratamientos a bajas temperaturas.

IV.4. Identificación de genes de estrés

IV.4. Expresión heteróloga en bacterias

IV.5. Efecto protector de una sHSP de chirimoyo expresada en *E. coli* durante diferentes situaciones de estrés.

IV.5.1. Estrés por elevadas temperaturas

IV.5.1.1. Análisis de la estabilidad termal de proteínas de
Escherichia coli.

IV.5.1.2. Análisis de la supervivencia bacteriana
a elevadas temperaturas

IV.5.2. Estrés por bajas temperaturas

IV.5.3. Estrés oxidativo

IV.5.4. Estrés salino

IV.6. Expresión en plantas

V. DISCUSIÓN

VI. CONCLUSIONES

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

El chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) es una especie arbórea originaria de regiones subtropicales americanas. Su cultivo en Europa está limitado a una estrecha franja costera de las provincias de Granada y Málaga, ya que para su adecuado crecimiento y, sobre todo, para su fructificación requiere unas condiciones microclimáticas especiales, siendo fundamentales valores altos de humedad relativa y la ausencia de cambios bruscos de temperatura, principalmente de heladas.

El cultivo del chirimoyo en España es considerado el más importante del mundo, con un área cultivada de 3266 Ha en 1999. En concreto para Granada es de gran importancia desde el punto de vista económico ya que en esta provincia se encuentra el 90% del área total de este cultivo en España (Pinto *et al.*, 2005).

Sus frutos, las chirimoyas, pueden tener forma de corazón, cónica, ovalada o forma irregular dependiendo de la polinización. La piel es de color verde y según la variedad puede ser lisa o puede tener pequeñas protuberancias cónicas. La pulpa, de color blanco, posee una textura carnosa y blanda y tiene numerosas semillas (21-41 semillas/ fruto) de color negro (Pinto *et al.*, 2005).

La recolección de las chirimoyas debe ser manual y debe realizarse cuando cada fruto, individualmente, alcanza un punto en su desarrollo fisiológico caracterizado por un incremento en el contenido hídrico, que hace que aumente de tamaño y que produce cambios típicos por estiramiento de las zonas intercarpelares, así como por variar su coloración hacia tonalidades verde pálidas. Los frutos recogidos con anterioridad al punto óptimo de desarrollo no maduran adecuadamente.

Una vez recolectados, el proceso de maduración se desarrolla rápidamente, ya que son frutos típicamente climatéricos, lo que significa que durante la maduración post-cosecha experimentan un incremento notable en la respiración, que en este caso va seguido inmediatamente de un proceso acelerado de senescencia. Los frutos, por lo tanto, tienen un periodo hábil para su consumo que oscila desde 4 o 5 días hasta cerca de dos semanas tras su recogida, dependiendo de las condiciones de conservación. El principal problema para la exportación de estos frutos deriva de sus características de maduración, que exige cadenas de comercialización muy ágiles para que los frutos lleguen a los consumidores en un tiempo previo al óptimo para su consumo.

Un problema adicional estriba en que, siendo un cultivo subtropical, tanto los árboles como los frutos son muy susceptibles a sufrir los denominados “daños por frío”, diferentes alteraciones en el fruto que impiden su maduración idónea y que aparecen como consecuencia de la exposición a temperaturas superiores a 0 °C e inferiores a la temperatura umbral. La aparición de daños por frío limita la expansión del cultivo y la conservación de los frutos a bajas temperaturas como método para incrementar su vida comercial post-cosecha. Numerosos trabajos (Lahoz *et al.*, 1990, 1993; Gutiérrez *et al.*, 1992b, 1994a; Sola *et al.*, 1994) han permitido determinar las condiciones óptimas de conservación post-cosecha de las chirimoyas, así como la valoración de los parámetros básicos de maduración. Aunque actualmente los frutos se están exportando a diversos países europeos, con una repercusión económica muy importante para el área de producción, en muchas ocasiones la rápida maduración post-cosecha entraña riesgos comerciales muy importantes.

I.1. Maduración del fruto del chirimoyo

La chirimoya es un fruto de maduración típicamente climatérica, caracterizada por un aumento en la respiración de los frutos seguido por un aumento de la concentración tisular de etileno, como consecuencia de una producción incrementada (Lahoz *et al.*, 1993). La maduración post-cosecha de los frutos es muy rápida, cuando se realiza a 20 °C oscila entre los 5 y 8 días, dependiendo del cultivar. Los cambios producidos durante el climaterio en las propiedades organolépticas de la chirimoya (color, textura, dulzura, astringencia, sabor y aroma) son consecuencia de cambios moleculares que afectan a la expresión génica, con inducción de determinadas proteínas, muchas de ellas con actividad enzimática.

Una característica del proceso de maduración de la chirimoya, común a la mayoría de los frutos, es la disminución en la firmeza del fruto asociada al incremento de la actividad de enzimas pectinolíticas que degradan las paredes celulares. Estudios hechos en varios frutos demostraron que, durante el proceso de ablandamiento, las paredes celulares pierden su estructura en un grado variable, lo que también ocurre en la chirimoya (Gutiérrez *et al.*, 1992a).

Por otra parte, durante la maduración de los frutos ocurre el pardeamiento del epicarpio y en ocasiones del mesocarpio. Este proceso puede verse incrementado en diversas situaciones ambientales o por lesiones debidas a golpes o infecciones locales, lo que hace que el fruto sea menos atractivo para los consumidores. El oscurecimiento es debido a la aparición de pigmentos coloreados originados por la acción de la polifenol oxidasa, cuya actividad se incrementa a lo largo de la maduración (Sanchez de Medina *et al.*, 1986), así

como por el cambio en la actividad de otros enzimas como la peroxidasa y la catalasa (Martínez-Cayuela *et al.*, 1986).

Como en la mayoría de los frutos climatéricos, en la chirimoya el carbono está almacenado en su mayor parte en forma de almidón dentro de los amiloplastos (Gutiérrez *et al.*, 1992b). El contenido de almidón de la chirimoya oscila entre un 10 y un 12% del peso total y durante el proceso de maduración a 22 °C se produce su degradación, de forma similar a lo observado en otros frutos (Biale y Young, 1981). Después de 6 días a 22 °C en las células de mesocarpio casi todo el almidón ha sido hidrolizado y como consecuencia se produce la acumulación de glucosa y fructosa, es en este momento cuando el fruto del chirimoyo alcanza la calidad óptima para su consumo (Gutiérrez *et al.*, 1992a). La acumulación de mono y disacáridos como consecuencia de la hidrólisis de almidón (Lahoz *et al.*, 1990; Sola *et al.*, 1994) produce un aumento del contenido de sólidos solubles totales (SST), lo que puede ser fácilmente monitorizado midiendo el índice de refracción de un extracto de mesocarpio (Lahoz *et al.*, 1993). Existe una correlación entre el contenido de SST y el sabor de la fruta y, aunque existen diferencias entre variedades, la chirimoya madura alcanza un valor de SST entre 18-24 °Brix (Palma *et al.*, 1993).

Durante la maduración de la chirimoya, al igual que en otros frutos tropicales y subtropicales, se produce una disminución acentuada del pH del mesocarpio como consecuencia de la generación y acumulación de diferentes ácidos orgánicos (Gutiérrez *et al.*, 1994b). El ácido orgánico mayoritario responsable del aumento de acidez no ha sido identificado en chirimoya. Se conoce que en *Annona atemoya* es el ácido málico (Palma *et al.*, 1993). Otros ácidos orgánicos que pueden contribuir a la disminución del pH son el ácido

cítrico y el ácido ascórbico, ya que han sido determinados en otras especies de *Annonas* (Palma *et al.*, 1993).

Las medidas de los parámetros relacionados con los procesos descritos (contenido de SST y pH) pueden ser utilizadas durante el periodo de maduración para el seguimiento de la misma.

Ninguno de los procesos descritos parece estar relacionado con la acumulación de etileno dentro del fruto, ya que ocurren antes del aumento brusco en su concentración. En la chirimoya, el pico de concentración de etileno ocurre en el quinto día después de la cosecha y está relacionado con la senescencia. No obstante, concentraciones de etileno en el límite umbral de detección pueden provocar la inducción enzimática (Lahoz *et al.*, 1993). Transcurrido este proceso, los frutos ya no son comestibles debido a su excesivo ablandamiento y a la aparición de sabores indeseables como consecuencia de diversas reacciones fermentativas. En esta etapa se observa una lenta disminución de la concentración de etileno (Lahoz *et al.*, 1993).

Debido a su rápida maduración climatérica, la chirimoya tiene una vida comercial muy corta cuando los frutos son almacenados sin control de la temperatura y maduran a la temperatura normal en las áreas y épocas de recogida que oscila entre 20-23 °C (Lahoz *et al.*, 1990, 1993). Varios grupos de investigadores han trabajado desde hace tiempo para desarrollar un método de conservación que retrase la senescencia de la chirimoya, pero la mayor parte de los tratamientos se ha demostrado que comprometen la calidad de la fruta.

Trabajos previos realizados en este Departamento (Sanchez de Medina *et al.*, 1986) han puesto de manifiesto que el almacenamiento de los frutos en cámaras con temperatura, humedad y presión controladas a diferentes condiciones

afecta a la textura, a diversas actividades enzimáticas, y al contenido de etileno, de sólidos solubles totales y pH de los frutos. Estas técnicas habrían podido ser utilizadas para prolongar la etapa de maduración, facilitando de esta forma la comercialización de los frutos. Sin embargo, la mayoría de estos tratamientos, aunque producen un retardo aparente en la maduración, ésta es anormal y resulta fuertemente acelerada al retornar el fruto a condiciones atmosféricas y temperaturas de 18-20 °C, produciéndose fermentaciones y reacciones colaterales que hacen que los frutos no adquieran la calidad óptima para el consumo (Lahoz *et al.*, 1990).

Otros trabajos sobre el control de la maduración de los frutos del chirimoyo se han centrado en la conservación de los mismos en cámaras de atmósfera controlada con diferentes presiones parciales de oxígeno y de anhídrido carbónico (de la Plaza, 1979; Stoll, 1983). Algunas de las condiciones ensayadas retrasan la maduración en torno a una semana, pero produciéndose pérdidas cuantiosas por infecciones fúngicas. Ha sido demostrado que el empleo de atmósferas controladas no alcanza a prolongar la conservación de los frutos más allá de lo conseguido exclusivamente con la refrigeración a temperaturas de 10-12 °C (Lahoz *et al.*, 1990).

I.2. Efecto de la temperatura sobre la maduración

La temperatura es el factor ambiental que mayor efecto ejerce sobre la velocidad a la que tiene lugar la maduración del fruto del chirimoyo. Los frutos recolectados maduran tanto más rápidamente cuanto más elevada sea la temperatura, obviamente dentro de un intervalo de temperaturas no extremas. Por encima de una temperatura máxima tiene lugar en poco tiempo una maduración

anómala, pudiendo aparecer sabores extraños en la pulpa, cambios de color irregulares, reblandecimiento no uniforme (An y Paull, 1990) o incluso inhibición de la producción de etileno (Klein, 1989) y del ablandamiento (Klein *et al.*, 1990). La refrigeración, por el contrario, produce un retardo en la aparición de la senescencia pero temperaturas inferiores a una temperatura umbral también desencadenan diversos daños, denominados genéricamente “daños por frío”, que pueden conducir a una maduración aberrante. Puede deducirse que la calidad del fruto depende en gran parte de la temperatura de conservación en el almacenamiento post-cosecha.

Durante la refrigeración la mayoría de los frutos evoluciona, más o menos lentamente, hacia una pérdida de calidad medida en términos de disminución de la textura de la pulpa, reducción en el contenido de ácidos orgánicos y azúcares, disminución del aroma de los frutos, pérdidas de peso por transpiración, posible aparición de podredumbres fúngicas y también alteraciones fisiológicas.

Aunque la susceptibilidad al descenso de temperatura depende del cultivar, del área de producción y del mes de recolección, se ha demostrado que 10 °C es la temperatura mínima de almacenamiento que permite la maduración de la chirimoya sin afectar a las características organolépticas normales de los frutos maduros y sin el desarrollo de los daños por frío (Lahoz *et al.*, 1990; Gutiérrez *et al.*, 1992a; 1992b). Cuando la maduración de los frutos se produce a 10 °C, todos los cambios típicos de la maduración, como la disminución del pH y el aumento del contenido de sólidos solubles totales del mesocarpio, se retrasaron entre 5-7 días (Lahoz *et al.*, 1990; Gutiérrez *et al.*, 1992a, 1994b).

El retraso en la maduración conseguido con la disminución de la temperatura de almacenamiento es evidente al estudiar el perfil temporal de la

concentración de etileno tisular en frutos refrigerados. En los frutos almacenados a 10 °C, el incremento en la concentración de etileno no es evidente hasta el día 11 postcosecha y el pico de concentración de etileno se alcanzó en el día 15, cuando ya se habían producido la mayoría de las reacciones típicas de la maduración y estaba cerca la senescencia (Lahoz *et al.*, 1993). Además, la concentración de etileno que se alcanza en los frutos conservados a 10 °C es muy superior a la de los frutos almacenados a 20 °C, aunque este hecho puede explicarse porque la disminución de la temperatura aumenta la solubilidad del etileno en los tejidos, al mismo tiempo que disminuye su velocidad de difusión (Lahoz *et al.*, 1990).

I.3. Daños por frío

Las plantas de regiones tropicales y subtropicales especialmente y, aunque en menor medida, las originarias de zonas templadas, experimentan disfunción fisiológica cuando son expuestas a bajas temperaturas. Este fenómeno tiene una gran repercusión económica dado que la conservación de los frutos y vegetales a bajas temperaturas es uno de los métodos más comunes empleados para retrasar la maduración post-cosecha y alargar la vida comercial de los productos agrícolas.

Se conocen como “daños por frío” a las alteraciones fisiológicas y organolépticas que sufren los frutos como resultado de su exposición a temperaturas bajas (pero siempre superiores a la temperatura de congelación de los tejidos) durante periodos de tiempo variables y que van en detrimento de su calidad. La temperatura umbral, por debajo de la cual se producen estos daños, depende de cada especie, pero suele estar comprendida entre 0 °C y 12 °C. La severidad de los daños aumenta al disminuir la temperatura de refrigeración y al prolongarse la exposición al frío.

El mecanismo por el que se desarrollan los daños por frío es aún dudoso y el primer evento responsable de las disfunciones metabólicas que conducen al daño de los tejidos todavía no ha sido definido (Gutiérrez *et al.*, 1994a; Artés *et al.*, 2003). El frío induce numerosas alteraciones fisiológicas y bioquímicas: estimula la tasa respiratoria y la emisión de etileno, reduce la fotosíntesis, altera la producción de energía, aumenta la permeabilidad de la membrana, inactiva algunos enzimas y altera la estructura celular (Artés *et al.*, 2003).

I.3.1. Síntomas de daños por frío

Los síntomas de daños por frío pueden aparecer durante la exposición a bajas temperaturas, pero es más habitual que aparezcan después de trasladar los frutos de nuevo a la temperatura normal de maduración (Gutiérrez *et al.*, 1994a).

Aunque hay muchas variables que afectan a la severidad de los daños por frío, los síntomas a nivel microscópico son bastante similares en todos los frutos (Kratsh *et al.*, 2000). Estos síntomas incluyen hinchamiento y desorganización de cloroplastos y mitocondrias, reducción en el tamaño y número de los gránulos de almidón, dilatación de los tilacoides y desapilamiento de los grana, microvesiculación del retículo endoplásmico, acumulación de gotículas lipídicas en el interior de los cloroplastos y condensación de la cromatina nuclear (Kratsh *et al.*, 2000).

Los síntomas macroscópicos con los que se manifiestan los daños por frío en frutas y hortalizas recolectadas son muy diversos, distinguiéndose dos categorías que con frecuencia se desarrollan simultáneamente en frutos tropicales y subtropicales. La primera muestra una naturaleza cualitativa y consiste en anomalías del desarrollo o del metabolismo, como la maduración incompleta y sabor y aroma insuficientes. La segunda categoría de daños por frío son

verdaderas enfermedades y se manifiestan de forma muy variada con: depresiones de la piel o picado, descomposición de tejidos, pardeamientos internos o superficiales (escaldadura), infiltración de agua en los espacios intercelulares, desarrollo de textura algodonosa o harinosa en la pulpa, pardeamiento de las membranas carpelares y una menor resistencia a los daños mecánicos y al ataque microbiano (Artés *et al.*, 2003).

En la chirimoya, el primer síntoma microestructural de los daños por frío es un daño general en las membranas celulares, incluyendo la membrana de los amiloplastos (Gutiérrez *et al.*, 1992b). A nivel microscópico los síntomas más importantes descritos en chirimoya son la dilatación de vesículas del retículo endoplásmico, la pérdida de ribosomas, la vesiculación de membranas y la acumulación de gotículas lipídicas en los cloroplastos y en el citosol (Gutiérrez, 1991). Los síntomas externos se manifiestan por la aparición de zonas pardeadas o punteaduras en la superficie externa del fruto, la pérdida de color de la pulpa, un proceso de maduración incorrecto y la aparición de vesículas rosa pálido alrededor de las semillas. Sin embargo, aunque no aparezcan estos síntomas, la chirimoya puede no madurar cuando es almacenada a bajas temperaturas (Gutiérrez *et al.*, 1992a).

I.3.2. Susceptibilidad a los daños por frío

La susceptibilidad de los frutos al frío depende de múltiples causas, siendo diferente de unas especies y variedades a otras. Las condiciones climáticas en que se han desarrollado los frutos, las condiciones de cultivo, la posición en el árbol y la edad fisiológica del fruto son factores que influyen en la susceptibilidad del fruto al enfriamiento y a otros tratamientos post-cosecha (Ferguson *et al.*, 1999). Tiene gran influencia la época en que se ha producido la recolección. Las

chirimoyas recolectadas en épocas tempranas, mes de septiembre, son muy sensibles a las bajas temperaturas, mientras que aquellas recolectadas en épocas más frías son más resistentes (Lahoz *et al.*, 1990), este efecto también se ha observado en otros frutos como el kiwi (Burdon *et al.*, 2007). Esta influencia podría estar relacionada con la cantidad de calor recibida por el fruto durante el último mes de desarrollo (Alique *et al.*, 2000).

Se han desarrollado diversos procedimientos de aplicación post-cosecha para combatir la aparición de daños por frío en frutos específicos. El tratamiento a altas temperaturas antes de iniciar la refrigeración disminuye la aparición de daños por frío en distintos frutos (Porat *et al.*, 2000; Saltveit, 2002; Zhang *et al.*, 2005; Sapitnitskaya *et al.*, 2006). Se han usado diversos métodos para aplicar el calor, baños de agua caliente (HWD), vapor de agua, aire caliente y un nuevo tratamiento que consiste en la aplicación de agua caliente a los frutos mientras que se mueven a través de unos rodillos (HWB) (Lurie, 1998; Porat *et al.*, 2000). Varios estudios recomiendan el uso de tratamientos cortos con calor como HWD y HWB ya que no alteran ningún parámetro de calidad del fruto como ocurre con tratamientos más prolongados (Porat *et al.*, 2000). Otras ventajas de estos tratamientos cortos es que son fáciles de aplicar y además protegen al fruto de las podredumbres que pueden aparecer durante la post-cosecha (Porat *et al.*, 2000). En el tratamiento térmico hay que tener en cuenta distintos factores que van a afectar a la uniformidad del tratamiento como la forma y el tamaño del fruto, ya que el calentamiento se produce como un gradiente de temperatura desde la superficie hasta el centro del fruto (Paull *et al.*, 2000).

Otro tratamiento descrito es el acondicionamiento a temperaturas intermedias antes de la posterior conservación a temperaturas más bajas. Este tratamiento se ha aplicado para disminuir los daños por frío en pomelo (Porat *et*

al., 2000; Sapitnitskaya *et al.*, 2006), níspero (Cai *et al.*, 2006) y aguacate (Wolf *et al.*, 2003). Los factores cruciales en la aplicación de esta técnica son la diferencia de temperatura entre el acondicionamiento y el almacenamiento y la duración del tratamiento (Wolf *et al.*, 2003; Cai *et al.*, 2006). Sapitnitskaya *et al.*, (2006) observaron que la aplicación de los dos tratamientos (tratamiento con calor y acondicionamiento) sucesivamente, es mucho más efectivo en la reducción de daños por frío que la aplicación de cada uno por separado, lo que sugiere que cada uno de los dos tratamientos activa diferentes rutas de defensa frente a las bajas temperaturas. El tratamiento con calor induce principalmente la expresión de varios genes de estrés y el acondicionamiento incrementa la expresión de enzimas que modifican la composición de lípidos de las membranas (Sapitnitskaya *et al.*, 2006).

El almacenamiento en atmósferas modificadas es una técnica normalmente usada junto con la refrigeración para prolongar la vida post-cosecha de distintos frutos y vegetales (Batu, 2003). El empleo de bajas concentraciones de O₂ y altas concentraciones de CO₂ ha resultado efectivo en la reducción de daños por frío en pepinos (Wang *et al.*, 1997), cítricos (Porat *et al.*, 2004), mango (Pesis *et al.*, 2000), chirimoya (Maldonado *et al.*, 2002; 2004) y plátano (Nguyen *et al.*, 2004). La respuesta de los frutos a altas concentraciones de CO₂ varía mucho entre distintas especies e incluye tanto efectos beneficiosos como efectos perjudiciales (Beaudry, 1999). Entre los efectos beneficiosos se encuentran la reducción de la respiración, la reducción del daño oxidativo, la reducción de la degradación de clorofila y la reducción en la sensibilidad al etileno que conduce a un retraso en la maduración (Beaudry, 1999). Si no se utilizan las condiciones adecuadas para cada producto, los efectos perjudiciales que pueden producirse son reacciones fermentativas, sabores desagradables y la disminución en la síntesis de aromas (Beaudry, 1999).

Recientemente se ha descrito que la aplicación de ácido salicílico puede reducir los daños por frío en melocotones (Wang *et al.*, 2006).

La protección frente a los daños por frío que producen estos y otros tratamientos puede ser explicada porque muchos estudios han demostrado la existencia en plantas de resistencia cruzada a diferentes condiciones de estrés. La exposición de la planta a una condición determinada de estrés moderado no solo induce resistencia a este tipo de estrés, sino que también protege a la planta frente a otros tipos de estrés (Wang *et al.*, 2003). Probablemente, todos estos tratamientos aplicados antes del almacenamiento a bajas temperaturas desencadenan una respuesta al estrés en el fruto que les hace más resistentes a las bajas temperaturas.

La protección cruzada al estrés en plantas puede estar mediada por proteínas de choque térmico (Heat Shock Proteins o HSPs) ya que se ha demostrado que muchos de estos tratamientos inducen la expresión de este tipo de proteínas (Sabehat *et al.*, 1998; Rozenvieg *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Sapitnitskaya *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Los niveles de estas proteínas se mantienen elevados durante el periodo de conservación a bajas temperaturas pero descienden rápidamente a valores normales cuando los frutos se transfieren a temperatura ambiente (Sabehat *et al.*, 1998).

Parece ser que el pretratamiento por sí solo tiene poco efecto en la expresión de genes, pero tiene un efecto potenciador o preparador que permite la activación posterior de los mecanismos de defensa del fruto durante la exposición a bajas temperaturas (Sapitnitskaya *et al.*, 2006).

I.4. Proteínas de choque térmico

Todos los organismos responden a elevadas temperaturas y a otros factores de estrés con la síntesis de un grupo de proteínas llamadas proteínas de choque térmico (HSPs) (Parsell y Linnik, 1993; Nover, 1991; Vierling, 1991).

Se utiliza el término de “proteínas de choque térmico” debido a que se demostró su existencia como respuesta a elevadas temperaturas (Ritossa, 1962; 1996), aunque también se denominan “proteínas de estrés” ya que otros muchos agentes estresantes desencadenan su síntesis.

Dentro del grupo de proteínas de estrés se incluyen diversas clases de proteínas que se diferencian en su peso molecular, propiedades y estructura (Gusev *et al.*, 2002). Algunas HSPs se requieren para el crecimiento en un rango normal de temperaturas, es decir, son constitutivas (HSC, Heat Shock Cognate), mientras que otras ayudan a las células a resistir los efectos dañinos de ciertas condiciones extremas como las elevadas temperaturas, el estrés oxidativo, la presencia de compuestos orgánicos, de metales pesados y de otros factores estresantes. Este efecto protector lo ejercen actuando como chaperonas moleculares, son proteínas que ayudan a otras proteínas a mantener o a recuperar su conformación nativa, estabilizando estados parcialmente desnaturizados. Durante el estrés se produce la desnaturización y disfunción de muchas proteínas, las HSPs ayudan a proteger frente al estrés controlando el adecuado plegamiento y conformación de proteínas estructurales (proteínas de membrana) y proteínas funcionales (enzimas) (Vinocur *et al.*, 2005). Las HSPs además están implicadas en la renaturalización de proteínas parcialmente desnaturizadas y en la eliminación de proteínas totalmente desnaturizadas.

Las HSPs de los diversos organismos presentan un elevado grado de conservación evolutiva respecto a la estructura primaria, los mecanismos de regulación y la función bioquímica. Las HSPs sintetizadas en eucariotas se clasifican en cinco clases según su peso molecular:

- HSP 100 (84 - 104 kDa)
- HSP 90 (82 - 96 kDa)
- HSP 70 (68 - 110 kDa)
- HSP 60 (53 - 62 kDa)
- sHSPs (small HSPs) (15 – 42 kDa)

Las HSPs 100, 90, 70 y 60 poseen sitios de unión para ATP y actividad enzimática ATPasa, ya que requieren la hidrólisis de ATP para su funcionamiento. Las sHSPs carecen de sitios de unión de ATP y funcionan por un mecanismo independiente de ATP (Gusev *et al.*, 2002).

I.4.1. HSP 100

Dentro de esta familia se incluyen un conjunto de proteínas con peso molecular comprendido entre 84 y 104 kD, de las que algunas son inducidas por calor y otras son constitutivas. Las proteínas de la familia HSP 100 en eucariotas están presentes en el citosol y en orgánulos citoplasmáticos (Agarwal *et al.*, 2001; Schrimmer *et al.*, 1994),

La primera HSP 100 fue descrita como componente de una proteasa dependiente de ATP en *Escherichia coli*, la proteasa caseinolítica (Clp) (Gottesman *et al.*, 1990). Esta proteasa está compuesta por dos subunidades, la

ClpP que es la subunidad con actividad proteasa y la ClpA que es la subunidad con actividad chaperona, es capaz de prevenir la agregación de las proteínas sustrato.

Posteriormente, se caracterizaron en procariotas y en eucariotas muchas proteínas relacionadas con ClpA como proteínas inducidas por estrés y por eso se incluyeron como miembros de la familia HSP 100 (Agarwal *et al*, 2001; Schirmer *et al*, 1996).

La primera HSP 100 aislada en eucariotas fue la HSP 104 de *Sacharomyces cerevisiae* (Sánchez *et al.*, 1992). Esta proteína se expresa en respuesta al estrés y juega un papel central en la tolerancia a condiciones extremas (Queitsh *et al*, 2000; Agarwal *et al*, 2001; Schirmer *et al*, 1996). También se han identificado y caracterizado proteínas de la familia HSP 100 en plantas superiores. Se han aislado HSPs 100 de *Arabidopsis* (Schirmer *et al*, 1994), soja (Lee *et al*, 1994), tabaco (Gallie *et al*, 2002), arroz (Katiyar-Agarwal *et al*, 2003), maíz (Nieto-Sotelo *et al*, 1999), trigo (Campbell, *et al*, 2001) guisante (Moore *et al*, 1993) y judía (Keeler *et al*, 2000). Experimentos de complementación de levaduras delecionadas de HSP 104 con una HSP 100 de plantas proporcionaron los primeros datos sobre su papel en la termoprotección (Lee *et al*, 1994; Schirmer *et al*, 1994). Posteriormente, se ha demostrado que la expresión de HSPs 100 en plantas se induce por una gran variedad de condiciones ambientales estresantes (calor, frío, alta salinidad, deshidratación y presencia de metales pesados) (Schirmer *et al*, 1994; Wang *et al*, 2004). Además su expresión también está regulada durante el desarrollo (Queitsh *et al*, 2000).

I.4.1.1. Estructura

Según la presencia de uno o dos dominios de unión a ATP, las HSPs 100 se dividen en dos clases, clase I y clase II (Schirmer *et al*, 1996; Agarwal *et al*, 2001; Miernyk, 1999). Las HSPs 100 de clase I contienen dos dominios de unión a ATP (NBD 1 Y NBD 2) separados por un dominio intermedio de longitud variable, a ambos lados de estos dominios se encuentran el dominio amino y el dominio carboxilo. Las HSPs 100 de clase II contienen solo un dominio de unión a ATP que es similar al dominio NBD 2 de las HSPs 100 de clase I.

En ausencia de nucleótidos las HSPs 100 se pueden encontrar como monómeros, dímeros o trímeros. Sin embargo, en presencia de ADP o ATP forman hexámeros en forma de anillo similares a los de las HSPs 60 (Schirmer *et al*, 1996; Agarwal *et al*, 2001).

I.4.1.2. Función

Todas las HSPs 100 son ATPasas, con una actividad enzimática basal de hidrólisis de ATP que es estimulada por proteínas específicas o péptidos. Todas ellas tienen además la función bioquímica común de actuar como chaperonas moleculares, empleando ATP producen cambios en el plegamiento de las proteínas (Schirmer *et al*, 1996).

La inducción de las HSPs 100 de levaduras y plantas ha sido descrita como un factor crítico para la termotolerancia. Además, se ha demostrado que median la tolerancia a arsénico (Agarwal *et al*, 2002). El papel que ejercen estas proteínas en la tolerancia al estrés es debido, al menos en parte, a su capacidad para promover la resolubilización de los agregados de proteínas desnaturalizadas que se forman en condiciones extremas (Schirmer *et al*, 1996; Agarwal *et al*, 2001,

2002). Las HSPs 100 solubilizan los agregados de proteínas y las liberan para que puedan ser plegadas por las HSPs 70, otro sistema chaperona también dependiente de ATP (Wang *et al.*, 2004). Se ha demostrado que las HSPs 100 de plantas actúan durante el periodo de recuperación (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2003; Parsell *et al.*, 1994; Queitsh *et al.*, 2000), sin embargo, la acumulación temprana de estas proteínas sugiere que también pueden ser importantes durante el periodo de estrés (Agarwal *et al.*, 2002).

Otra función descrita para las HSPs 100 de plantas es su papel como reguladores de la expresión de genes (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2001). Las HSPs 101 de tabaco y de trigo aumentan la traducción del RNA del virus del mosaico del tabaco (Wells *et al.*, 1998), uniéndose a la región 5' del RNA viral. Esto podría representar un mecanismo específico de los virus de plantas para regular su replicación y movilidad aprovechándose de la respuesta del hospedador a la infección (Queitsh *et al.*, 2000; Agarwal *et al.*, 2002; Katiyar-Agarwal *et al.*, 2001). Las HSPs 101 podrían afectar también a la traducción de algunos mRNA celulares y de este modo contribuir a la termotolerancia.

Por otra parte, las HSPs 100 cloroplastídicas están implicadas en el transporte de proteínas precursoras a través de la membrana del cloroplasto (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2001). Esta función de las HSPs 100 es análoga a la observada para las HSPs 70 en los sistemas de importación a la mitocondria y al retículo endoplásmico (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2001).

I.4.2. HSP 90

Dentro de la familia HSP 90 se incluyen proteínas con un peso molecular comprendido entre 82 y 96 kD. Las proteínas de la familia HSP 90 son proteínas muy conservadas evolutivamente y esenciales para la viabilidad de las células eucariotas (Picard *et al.*, 2002; Krishna *et al.*, 2001). La denominación como HSPs deriva de que fueron identificadas como proteínas cuya concentración se incrementaba con el estrés térmico, sin embargo, la caracterización posterior de estas proteínas reveló que son muy abundantes aún sin estrés celular, representando el 1-2 % del contenido proteico de la célula (Picard *et al.*, 2002; Katschinski, 2004).

Las proteínas de la familia HSP 90 están presentes en células eucariotas y procariotas. El ortólogo procariota, HtpG, presenta una gran homología con las proteínas eucariotas, sin embargo no es indispensable para la viabilidad celular. En células animales, las HSPs 90 se localizan en el citosol y en algunos orgánulos citoplasmáticos. La HSP 90 citosólica tiene dos isoformas la HSP 90 α y la HSP 90 β , en el retículo endoplásmico se encuentra la proteína grp 94 (glucose-regulated protein) y en las mitocondrias, la proteína TRAP 1 (Felts *et al.*, 2000). También se han aislado genes de HSPs 90 en varias especies de plantas superiores. Se han aislado HSPs 90 de *Arabidopsis thaliana* (Conner *et al.*, 1990; Takahashi *et al.*, 1992; Yabe *et al.*, 1994; Krishna *et al.*, 2001), *Pharbitis nil* (Felshein y Das, 1992), *Licopersicum esculentum* (Koning *et al.*, 1992), *Zea mays* (Marrs *et al.*, 1993) y *Brassica napus* (Krishna *et al.*, 1995). Las HSPs 90 en plantas se localizan en el citosol, retículo endoplásmico, plastos y mitocondrias (Krishna *et al.*, 2001). La expresión de las HSPs 90 de plantas está regulada por el desarrollo (Koning *et al.*, 1992; Marrs *et al.*, 1993; Krishna *et al.*, 1995) y además

es sensible al estrés por frío (Krishna *et al.*, 1995) y a los cambios luz/oscuridad (Katschinski, 2004).

I.4.2.1. Estructura

La estructura de las HSPs 90 consiste en un dominio amino terminal de aproximadamente 25 kD, unido al extremo carboxilo de 55 kD por una región rica en ácido glutámico de longitud y composición variable entre especies e isoformas (Pearl *et al.*, 2000; Katschinski, 2004; Krishna *et al.*, 2001).

Se han identificado dos sitios de unión a ATP, uno en el extremo amino y otro en el extremo carboxilo. Las HSPs 90 eucariotas se encuentran predominantemente en forma dimérica. En ausencia de ATP, los dos monómeros se unen por el dominio de dimerización localizado en el extremo carboxilo, manteniendo separados los dos dominios amino terminal. La unión de ATP y las elevadas temperaturas hacen que la HSP 90 pase a una forma en la que los dos dominios amino están asociados (Pearl *et al.*, 2000). Este cambio conformacional parece ser que permite la unión del sustrato (Katschinski, 2004).

En el extremo carboxilo terminal, casi todas las HSPs 90 eucariotas tienen el pentapéptido MEEVD que es esencial para la unión de las HSPs 90 a los dominios TPR (repeticiones de tetratricopéptidos) de sus proteínas cochaperonas (Picard, 2002).

I.4.2.2. Función

La mayoría de los sustratos que se conocen de las HSPs 90 son proteínas de transducción de señales de membrana, receptores de hormonas esteroideas y proteína kinasas. Debido a que la unión de las HSPs 90 a estas proteínas es

esencial para su actividad, las chaperonas de la familia HSP 90 van a desempeñar un papel clave en procesos celulares como las rutas de transducción de señales de membrana, el control del ciclo celular, la degradación de proteínas y la silenciamiento de genes (Young *et al.*, 2001, Zhang *et al.*, 2003). Además, desempeñan un papel muy importante en la evolución morfológica y en la adaptación al estrés en *Drosophila* (Rutherford *et al.*, 1998) y *Arabidopsis* (Queitsch *et al.*, 2002).

En la última década se han identificado dos características claves del mecanismo de acción de las HSPs 90: a) las HSPs 90 tienen actividad chaperona dependiente de ATP y b) una HSP 90 sola es incapaz de promover el plegamiento y/o activación de ninguna de sus proteínas sustrato, para su actividad requiere formar parte de un heterocomplejo de chaperonas citoplasmáticas (CCH) que facilita el plegamiento de las proteínas sustrato a su conformación estable o activa (Zhang *et al.*, 2003).

El CCH ha sido estudiado principalmente en mamíferos (Miernyk, 1999). Los principales componentes de este complejo son HSPs 90, HSPs 70 y sus cochaperonas Hop (HSP 70 y HSP 90-organizing protein), p23, HSP 40, y Hip (HSP 70 interacting protein). Las inmunofilinas de alto peso molecular también forman parte del complejo pero no son esenciales para la unión y el plegamiento de proteínas sustrato (Krishna *et al.*, 2001). La chaperona p50 solo se ha detectado en complejos de HSP 90 con proteína kinasas.

En plantas todavía no se han identificado las proteínas sustrato de las HSP 90, pero se ha demostrado la existencia de un complejo chaperona similar al de mamíferos, que es capaz de activar al receptor de glucocorticoides de mamíferos *in vitro* (Stancato *et al.*, 1996). Dentro de este complejo se han identificado HSPs

90, HSPs 70, inmunofilinas de alto peso molecular y Hop (Owens-Grillo *et al.*, 1996; Stancato *et al.*, 1996; Reddy *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2003).

La disponibilidad del genoma completo de *Arabidopsis thaliana* ha permitido detectar genes que codifican proteínas homólogas a todos los componentes del complejo de HSP 90 de mamífero (Krishna *et al.*, 2001). La identificación de un complejo chaperona en plantas similar al de células animales sugiere que el papel de este complejo está también en las vías de transducción de señales de membranas en células vegetales. Entre los sustratos potenciales del complejo HSP 90 de plantas se encuentran varias proteína kinasas y el receptor de brasinoesteroides. De esta forma la familia de HSPs 90 podría intervenir en el control del crecimiento y desarrollo de la planta (Krishna *et al.*, 2001).

I.4.3. HSP 70

Las HSPs 70 constituyen un grupo de chaperonas moleculares muy conservadas evolutivamente, con un peso molecular comprendido entre 68 y 110 kD (Vierling, 1991; Miernyk, 1997). Algunos miembros de esta familia se expresan constitutivamente y se denominan HSC 70 (70 kD Heat Shock Cognate), mientras que otros se expresan solamente cuando el organismo es sometido a estrés ambiental como temperaturas extremas, anoxia o la presencia de metales pesados, en este caso se denominan HSP 70 (70 kD Heat Shock Protein) (Miernyk, 1999). No se han descrito diferencias en la función chaperona entre las proteínas constitutivas y las proteínas inducidas por estrés.

Las HSPs 70 se encuentran en células eucariotas y procariotas. La proteína mejor estudiada es la HSP 70 procariota denominada Dna K y sus cochaperonas

Dna J y GrpE. En eucariotas se han encontrado proteínas de la familia HSP 70 en todos los compartimentos subcelulares (Miernyk, 1997). Las HSPs 70 localizadas en el retículo endoplásmico también se denominan BiP (Binding Protein) o GRP78 (78 kD Glucose-Regulated Protein). Esta diferente localización subcelular implica especificidad funcional (Vierling 1991; Lin *et al.*, 2001). Recientemente, se ha identificado en eucariotas un grupo de proteínas de mayor tamaño pero que, según sus propiedades estructurales y funcionales, se han considerado una subfamilia de las HSP 70. Dentro de esta subfamilia se incluyen la Hsp 110 de mamíferos, las proteínas SSE de levaduras y sus homólogos en el retículo endoplásmico y los ortólogos de Grp 170 en mamíferos (Lin *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004).

En plantas se han identificado HSPs 70 de diferentes especies (Vierling, 1991). Al igual que en otros eucariotas, en plantas se han identificado HSP 70 en todos los compartimentos subcelulares (Miernyk, 1997; Lin *et al.*, 2001). El genoma de *Arabidopsis* contiene 18 genes que codifican para proteínas de la familia HSP 70, de los cuales 14 pertenecen a la subfamilia Dna K y 4 a la subfamilia Hsp110/SSE (Lin *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 2001). En el genoma de espinaca se han encontrado al menos 12 miembros de la familia HSP 70 (Guy *et al.*, 1998). La mayoría de estos genes se expresan durante el crecimiento normal (Lin *et al.*, 2001) y algunos se expresan en respuesta a condiciones ambientales de estrés como calor, frío, sequía, así como en algunas fases del desarrollo (Lin *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 2001; Guy *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2006). Además, algunas HSPs 70 se expresan en respuesta a la infección por virus (Aparicio *et al.*, 2005). La sobreexpresión de HSP 70 está relacionada con un aumento de la tolerancia a altas temperaturas (Lee *et al.*, 1996), bajas temperaturas (Zhang *et al.*, 2006), sequía (Cho *et al.*, 2006) y a estrés salino (Sugino *et al.*, 1999).

I.4.3.1. Estructura

Las HSPs 70 constan de un dominio amino de aproximadamente 45 kD, es el dominio con actividad ATPasa, y de un dominio carboxilo de aproximadamente 25 kD. Este dominio carboxilo consiste, a su vez, en una región de 15 kD que contiene el sitio de unión y reconocimiento de péptidos y una región de 10 kD, que es más variable en secuencia y estructura, que probablemente tenga un papel regulador (Miernyk, 1997).

Ambos dominios están evolutivamente muy conservados, los distintos tipos de HSP 70 se diferencian en la secuencia de los extremos amino y carboxilo, donde reside la información para la localización subcelular (Hartl, 1996; Miernyk, 1997).

La unión de ATP al extremo amino produce un cambio conformacional en el extremo carboxilo que modifica la afinidad por los sustratos (Bukau *et al.*, 1998). Cuando la HSP 70 se une a ADP, el dominio de unión a sustratos está “cerrado” y el intercambio de sustratos es lento, la unión de ATP hace que se “abra” este dominio, lo que produce un rápido intercambio de sustratos (Bukau *et al.*, 1998; Mayer *et al.*, 2005).

I.4.3.2. Función

Las HSPs 70 van a actuar como chaperonas moleculares. Tienen funciones esenciales previniendo la agregación proteica y asistiendo al plegamiento de proteínas no nativas en condiciones normales y de estrés (Hartl, 1996). También están involucradas en procesos de importación y translocación de proteínas y facilitan la degradación de proteínas inestables dirigiéndolas hacia los lisosomas o a los proteasomas (Hartl, 1996; Miernyk, 1997; Bukau *et al.*, 1998; Mayer *et al.*,

2005). Esta versatilidad de funciones de las HSPs 70 deriva de su capacidad de unirse a los fragmentos hidrofóbicos expuestos de las proteínas no plegadas (Miernyk, 1997; Hartl, 1996).

Las HSPs 70 no participan activamente en el plegamiento de la proteína sino que la unión al sustrato produce la estabilización de estados no plegados y la liberación permite el plegamiento correcto (Hartl, 1996). Los ciclos continuos de unión y liberación de las proteínas sustratos están acoplados a la actividad ATPasa intrínseca de las HSPs 70 que requiere, a su vez, la actuación de las cochaperonas de HSP 70. Esta maquinaria chaperona ha sido mejor estudiada en procariontes, donde el componente central es la proteína Dna K que funciona como chaperona en asociación con Dna J, que estimula la hidrólisis de ATP, y Grp E que favorece el cambio de ADP por ATP, restableciendo el punto de partida del ciclo chaperona (Mayer *et al.*, 2005). En mamíferos, las principales cochaperonas de las HSPs 70 son HSP 40 (análogo de Dna J), Bag-1 (también denominado Hap de HSP 70 associating protein) que es un factor intercambiador de nucleótidos, Hip que estabiliza el estado ADP de las HSPs 70 y Hop (Miernyk, 1997; Hartl, 1996; Miernyk, 1999; Mayer *et al.*, 2005). Además se han identificado distintas cochaperonas de las HSPs 70 de los orgánulos como Sec63p en el retículo endoplásmico y Tim44p (Translocation across the inner membrane) en la mitocondria (Miernyk, 1997).

En plantas se conoce menos detalladamente la maquinaria chaperona de las HSPs 70, pero se sabe que presenta características comunes con el complejo bacteriano y con el de mamíferos (Miernyk, 1999). Además, se ha caracterizado una proteína de *Arabidopsis* que estimula el cambio de ADP por ATP en las HSPs 70 y se han identificado análogos de Dna J y de Hop (Miernyk, 1999, Zhang *et al.*, 2003).

Además de su función chaperona general, las HSPs 70 también desempeñan un papel regulador de la expresión de otros genes asociados con el estrés (Lee *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 2004). La interacción entre HSP 70 y HSF (Heat Shock Factor) previene la trimerización y unión de HSF al elemento de respuesta al choque térmico (HSE), bloqueando la activación transcripcional de los genes de choque térmico (Morimoto, 1998; Kim *et al.*, 2002; Katschinski, 2004). Las HSPs 70 también están implicadas en la modulación de las proteína kinasas A y C y de algunas proteína fosfatasa (Ding *et al.*, 1998). De esta forma, las proteínas HSP 70 podrían participar en la regulación de la expresión de muchos genes en condiciones normales de crecimiento y durante el estrés (Wang *et al.*, 2004).

I.4.4. HSP 60

Las HSPs 60, también denominadas “chaperoninas”, son la familia de chaperonas moleculares mejor estudiada (Miernyk, 1999; Hartl, 1996). Las HSPs 60 son indispensables para el funcionamiento adecuado de todos los organismos eucariotas y procariotas a todas las temperaturas (Levy-Rimler *et al.*, 2002; Ranson *et al.*, 1998).

Las chaperoninas están clasificadas en dos subfamilias, las chaperoninas de tipo I o tipo GroE y las chaperoninas de tipo II. Las chaperoninas de tipo I, cuyo principal representante es la proteína GroEL de bacterias, están presentes en procariotas y en mitocondrias y plastos de organismos eucariotas, son proteínas inducibles por estrés a excepción de las cloroplastídicas (Hartl, 1996; Wang *et al.*, 2004). Las chaperoninas de tipo II incluyen el termosoma de arqueas y el complejo chaperonina del citosol de células eucariotas también denominado CCT

(Chaperonin Containing TCP-1), TCP-1 (T-Complex Protein-1) o TriC (TCP-1 ring Complex) (Miernyk, 1999; Ranson *et al.*, 1998), siendo inducibles por estrés sólo las chaperoninas de arqueas (Hartl, 1996).

En plantas se han estudiado principalmente las chaperoninas de tipo I. La primera chaperonina vegetal descrita fue una chaperonina cloroplastídica que se denominó proteína de unión a Rubisco (Vierling, 1991). En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado 11 genes que codifican para chaperoninas de tipo I, 7 de ellos corresponden a proteínas cloroplastídicas y 4 a proteínas mitocondriales (Hill *et al.*, 2001). Se ha descrito que la expresión de algunas proteínas mitocondriales está regulada durante el desarrollo y se induce por choque térmico (Prasad *et al.*, 1992). Las chaperoninas de tipo II en plantas son poco abundantes (Miernyk, 1999). En el genoma de *Arabidopsis* se han identificado 9 genes que codifican chaperoninas de tipo II (Hill *et al.*, 2001). Estas proteínas pueden ser importantes en la protección de las plantas frente al estrés osmótico y salino, ya que la expresión heteróloga de la proteína TCP-1 α de *Bruguiera sexangula* en *E. coli* incrementa la viabilidad de los cultivos bacterianos en presencia de concentraciones elevadas de sal (Yamada *et al.*, 2002).

I.4.4.1. Estructura

Las chaperoninas de tipo I forman estructuras oligoméricas formadas por dos anillos apilados de 7 subunidades cada uno (Hartl, 1996; Bukau *et al.*, 1998). La cavidad central del cilindro proporciona el ambiente adecuado para el plegamiento de la proteína sustrato (Levy-Rimler *et al.*, 2002; Hartl, 1996). Las chaperoninas procariotas y mitocondriales están formadas por 14 subunidades

iguales, sin embargo, las chaperoninas cloroplastídicas están formadas por dos tipos de subunidades, α y β (Hill *et al.*, 2001).

Cada subunidad consta de tres dominios: el dominio ecuatorial que contiene el sitio de unión a ATP y es por donde se producen las interacciones entre subunidades, el dominio apical que contiene el sitio de unión de péptidos y de unión a su cochaperona GroES y el dominio intermedio que está localizado entre los dominios ecuatorial y apical y transfiere la información alostérica entre ellos (Yamada *et al.*, 2002; Ranson *et al.*, 1998; Hartl, 1996; Levy-Rimler *et al.*, 2002).

Las chaperoninas de tipo II forman estructuras similares a las de tipo I pero con la diferencia de que cada anillo está formado por 8 o 9 subunidades distintas (Ranson *et al.*, 1998; Hartl, 1996). El dominio apical de estas chaperoninas presenta una extensión que podría realizar un papel similar al de GroES para las de tipo I (Ranson *et al.*, 1998).

I.4.4.2. Función

Las HSPs 60 actúan como chaperonas moleculares y desempeñan un papel esencial ayudando a proteínas recién sintetizadas y/o recién translocadas a conseguir su conformación nativa, en condiciones normales y en condiciones de estrés (Hartl, 1996; Wang *et al.*, 2004). Las chaperoninas cloroplastídicas participan en el plegamiento de proteínas tan importantes como la Rubisco, y por lo tanto son esenciales en el desarrollo del cloroplasto (Wang *et al.*, 2004). Las chaperoninas citosólicas, a diferencia de las de orgánulos, parecen tener un rango más restringido de sustratos (Hartl, 1996).

La actividad chaperona de las HSP 60 requiere la unión e hidrólisis de ATP y en el caso de las chaperoninas de tipo I también la unión de la cochaperona GroES en bacterias y de la proteína cpn10 en eucariotas (Bukau *et al.*, 1998). La proteína sustrato se une a la cavidad central de la chaperona a través de las regiones hidrofóbicas expuestas en la proteína desplegada (Hartl, 1996; Bukau *et al.*, 1998). La unión de ATP y GroES o cpn10 produce un cambio conformacional de la chaperona, que supone un aumento de tamaño de la cavidad central y que además pasa a ser hidrofílica, proporcionando así un ambiente adecuado para el plegamiento de la proteína (Bukau *et al.*, 1998). La hidrólisis del ATP es esencial para la liberación de la proteína de la chaperona.

Las chaperoninas de tipo II no necesitan la actuación de cochaperonas para su funcionamiento (Miernyk, 1999). Recientemente se ha identificado un cofactor, la prefoldina, que se une a las proteínas recién sintetizadas y las transfiere a las chaperoninas tipo II para su plegamiento (Hill *et al.*, 2001).

I.4.5. Small HSPs (sHSPs)

Las proteínas de la familia sHSPs tienen un peso molecular entre 15 y 42 kDa (Haslbeck *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2002). Las sHSPs se encuentran en organismos eucariotas y procariotas pero el número de sHSPs encontrado en diferentes especies varía significativamente. Los organismos procariotas suelen tener una o dos sHSPs, excepto algunas especies del género *Rhizobium* que tienen diez sHSPs (Munchbach *et al.*, 1999). En levaduras se han encontrado dos sHSPs, mientras que en el resto de eucariotas el número de genes que codifican sHSPs es mucho mayor, por ejemplo cuatro genes diferentes en *Drosophila melanogaster*,

dieciséis en *Caenorhabditis elegans*, diez en humanos y diecinueve en *Arabidopsis thaliana* (Haslbeck *et al.*, 2005; Scharf *et al.*, 2001).

Las plantas se caracterizan por una especial abundancia y diversidad de sHSPs, lo que está considerado como reflejo de su mayor necesidad de adaptarse a cambios en las condiciones ambientales como la temperatura, la intensidad de luz, el grado de salinidad y de humedad (Sun *et al.*, 2002). Las sHSPs son relevantes en la respuesta al estrés en plantas superiores por varias razones: las sHSPs son las proteínas predominantes durante el estrés térmico en muchas plantas, a diferencia de otros eucariotas donde la proteína que se expresa mayoritariamente en respuesta a esta situación es la HSP 70 (Waters *et al.*, 1996); además, en condiciones de estrés térmico algunas sHSPs pueden llegar a alcanzar hasta el 1% del total de proteínas en las células de hojas y raíces (Hsieh *et al.*, 1992; DeRocher *et al.*, 1991); en tercer lugar, las plantas tienen al menos seis familias de genes que codifican a sHSPs, mientras que otros eucariotas tienen sólo de uno a cuatro genes para sHSPs (Waters *et al.*, 1996); finalmente, las plantas son los únicos eucariotas en los que se han descrito sHSPs localizadas en orgánulos subcelulares (Waters *et al.*, 1996), con la excepción de la HSP22 mitocondrial de *Drosophila melanogaster* (Morrow *et al.*, 2000), en el resto de eucariotas están localizadas únicamente en el citosol.

I.4.5.1. sHSPs de plantas: clases y estructura

Las sHSPs de plantas están codificadas por genes nucleares y se agrupan en seis clases según el grado de homología en la secuencia de aminoácidos y la localización intracelular (Sun *et al.*, 2002):

- Las clases CI, CII y CIII están localizadas en el citosol o en el núcleo, (Waters *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2002; Scharf *et al.*, 2001). Su distribución en el citosol depende de la duración de las condiciones de estrés, pasando de estar distribuidas uniformemente a formar gránulos de choque térmico (HSGs) si el tiempo de estrés se prolonga (Nover *et al.*, 1989). Se ha demostrado también en soja y en tomate que en situaciones de estrés algunas sHSPs son dirigidas al núcleo, de forma similar a lo que ocurre durante varias etapas del desarrollo (Kadyrzhanova *et al.*, 1998). Las proteínas de la clase CIII se localizan preferencialmente en el núcleo (Scharf *et al.*, 2001).
- La clase P está localizada en los cloroplastos (Vierling, 1991; Sundby *et al.*, 2005).
- La clase ER se localiza en el retículo endoplásmico (Helm *et al.*, 1993; Zhao *et al.* 2007).
- La clase M está localizada en las mitocondrias (Lenne *et al.*, 1994, 1995; LaFayette *et al.*, 1996).

Recientemente se ha descrito la existencia de sHSPs localizadas en peroxisomas que podrían constituir una nueva clase de sHSPs (Ma *et al.*, 2006).

En cuanto a la estructura, todas las sHSPs se caracterizan por poseer un dominio carboxilo terminal extremadamente conservado en todas las especies vegetales llamado dominio de choque térmico o dominio α -cristalino (ACD) por su similitud con una región similar de las proteínas α -cristalinas del ojo de los vertebrados. Este dominio está flanqueado por un dominio amino terminal y una región denominada extensión C-terminal (Waters *et al.*, 1996; Mac Rae, 2000; Sun *et al.*, 2005) (Figura I.1).

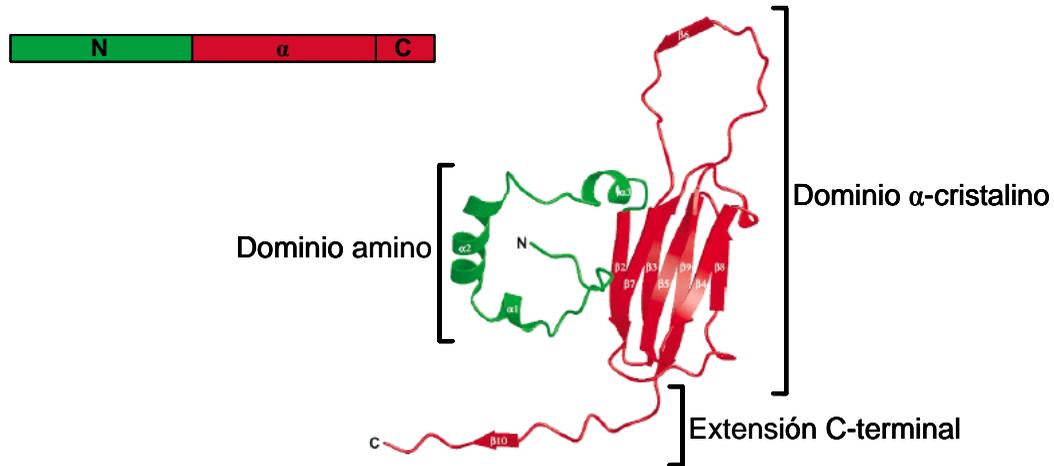


Figura I.1. Estructura de las sHSPs (van Montfort *et al.*, 2001).

El dominio α -cristalino, de aproximadamente 100 aminoácidos, consiste en un β -sandwich con dos láminas β antiparalelas (Scharf *et al.*, 2001) por lo que se puede dividir en dos subdominios, denominados consenso I y II, separados por una región hidrofílica de longitud variable (Waters *et al.*, 1996). El consenso I tiene 27 aminoácidos de longitud, de los cuales el motivo Pro- $X_{(14)}$ -Gly-Val-Leu es una secuencia conservada en la mayoría de sHSPs. En el consenso II existe un motivo secuencial similar, Pro- $X_{(14)}$ -X-Val/Leu/Ile-Val/Leu/Ile (Waters *et al.*, 1996).

El dominio amino terminal es bastante divergente entre las distintas clases de sHSPs, además las sHSPs cloroplastídicas, mitocondriales y las localizadas en el retículo endoplásmico tienen la secuencia señal típica de exportación al orgánulo correspondiente. Sin embargo, comparando las secuencias de sHSPs de

la misma clase entre varias especies de plantas, se pueden identificar regiones consenso dentro del dominio amino terminal que son específicas de cada clase (Chen y Vierling, 1991; Waters, 1995). La existencia de estas regiones conservadas y específicas de cada clase de sHSP sugiere que pueden tener un papel importante en la función de estas proteínas (Waters *et al.*, 1996).

Las sHSPs cloroplastídicas tienen en la región amino terminal un dominio de 28 aminoácidos rico en metionina, el dominio consenso III, que forma una α -hélice anfipática (Vierling, 1991; Sundby *et al.*, 2005). Una cara de la hélice consiste en metioninas y otros residuos hidrofóbicos y la cara opuesta en residuos fuertemente hidrofílicos (Sundby *et al.*, 2005). El extremo amino de las sHSPs citosólicas de clase II contiene una pequeña región de 11 aminoácidos conservada en la mayoría de las especies, mientras que en las sHSPs citosólicas de clase I es de 17 aminoácidos (Waters *et al.*, 1996). Igualmente, las sHSPs mitocondriales presentan dos secuencias cortas pero relativamente conservadas dentro del dominio amino terminal, localizadas entre los aminoácidos 95-105 y 142-158 (Basha *et al.*, 1999). Esta diversidad en la región amino terminal puede ser muy importante en la función de las sHSPs, ya que les permite que puedan unirse a un amplio rango de sustratos (Sun *et al.*, 2002).

La extensión C-terminal también es bastante divergente entre las distintas clases de sHSPs, con la excepción del motivo Ile/Val-X-Ile/Val que está conservado en todos los tipos de sHSPs (Sun *et al.*, 2005; Studer *et al.*, 2002). Esta región, aunque no tiene un papel directo en la unión de los sustratos, contribuye a la actividad chaperona estabilizando los oligómeros de sHSPs (Sun *et al.*, 2005).

Una característica común de las sHSPs eucariotas es su tendencia a unirse formando complejos de peso molecular elevado, de 200-300 kDa. Parece ser que la formación de estos complejos y los cambios en el estado de oligomerización son esenciales para la función de las sHSPs (Giese *et al.*, 2002). Durante el periodo de estrés se produce la disociación de los complejos hasta dímeros, a los que se unen las proteínas sustrato. Una vez asociadas las sHSPs con las proteínas desnaturalizadas se vuelven a unir formando los complejos de gran peso molecular. La formación de nuevo de estos complejos es crítica para la actividad (Giese *et al.*, 2002; van Montfort *et al.*, 2001; Scharf *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2003; 2006).

En mamíferos, la disociación de los complejos de sHSPs está regulada por fosforilación/ desfosforilación de residuos de serina en las secuencias conservadas Arg-X-X-Ser, sin embargo las sHSPs de plantas no contienen este motivo secuencial. Además, las sHSPs de plantas no están fosforiladas *in vivo* y no experimentan la disociación que acompaña a la fosforilación de las sHSPs de mamíferos. Todo esto indica que es improbable que la fosforilación sea un mecanismo regulador importante de las sHSPs de plantas (Suzuki *et al.*, 1998), aunque se ha encontrado que la ZmHSP22 mitocondrial de maíz se fosforila por una proteína kinasa mitocondrial (Lund *et al.*, 2001). Sin embargo, el efecto de la fosforilación sobre la actividad chaperona de esta sHSP mitocondrial y sobre su estado de oligomerización todavía tiene que ser investigado.

El dominio α -cristalino, homólogo en todas las sHSPs, participa en la formación de los complejos, pero se ha visto que este dominio por sí solo no es suficiente para la formación de dímeros (Studer *et al.*, 2002), sino que para la formación de complejos multiméricos funcionales son necesarias porciones adicionales de las regiones amino y carboxilo terminales (van Montfort *et al.*,

2001; Studer *et al.*, 2002; Haslbeck *et al.*, 2004). Es probable que el tamaño y las propiedades de los complejos estén en parte controlados por el volumen del dominio amino (Salerno *et al.*, 2003). Es interesante destacar que nunca se forman hetero-oligómeros ni siquiera entre las sHSPs citosólicas de clase I y II, a pesar de tener la misma localización intracelular (Helm *et al.*, 1997). Estos resultados nos indican que las distintas clases de sHSPs pueden desempeñar distintas funciones.

Los complejos oligoméricos formados por las sHSPs de plantas suelen estar compuestos por 12 subunidades. Por ejemplo, el complejo formado por la TaHSP 16.9 CI de trigo está organizado como un doble disco, cada uno constituido por seis subunidades asociadas en dímeros o en trímeros (van Montfort *et al.*, 2001) (Figura I.2).

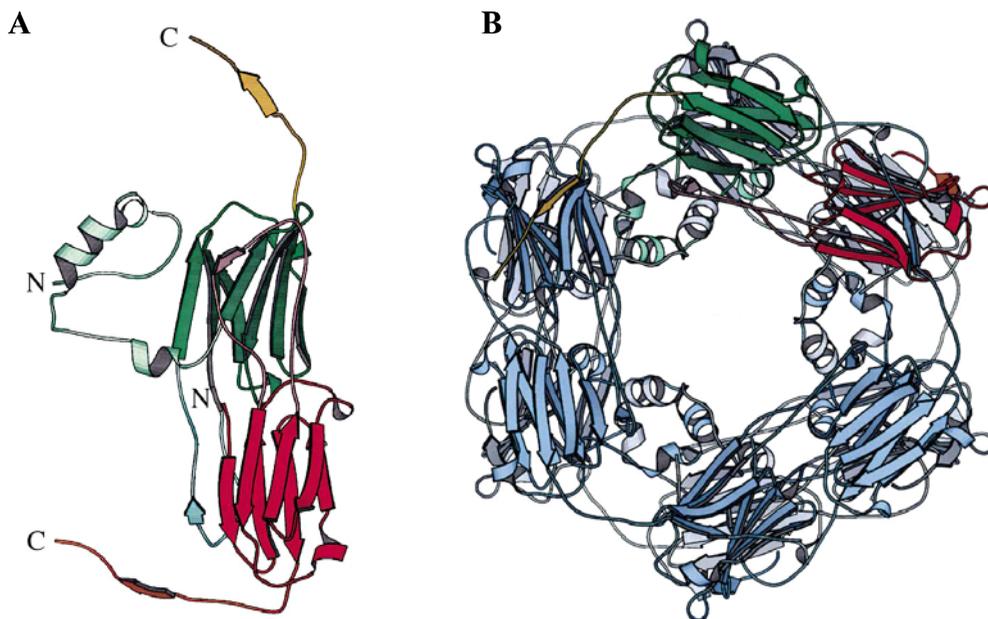


Figura I.2. A. Dímero de TaHSP 16.9 CI, los dos monómeros presentan distintas conformaciones y se representan en rojo y en verde. B. Oligómero de TaHSP 16.9 CI. (Sun *et al.*, 2002).

En ciertas condiciones de estrés, las sHSPs forman agregados de mayor tamaño que los complejos descritos llamados gránulos de choque térmico (HSGs), con un peso molecular de aproximadamente 1 MDa (Nover, 1991). La formación reversible de estas estructuras ocurre principalmente a temperaturas muy altas o por la exposición a estrés térmico moderado pero durante largos periodos de tiempo.

Todas las sHSPs incluyendo las sHSPs localizadas en orgánulos pueden formar HSGs (Waters *et al.*, 1996). Sin embargo, los HSGs estudiados contienen principalmente sHSPs citosólicas de clase CI y CII, HSPs 70 y el factor de transcripción HSFA 2 (Nover *et al.*, 1989). El estudio de la composición y estructura de estos gránulos se ha visto dificultado por su insolubilidad por lo que su significado funcional todavía no se conoce, aunque se ha propuesto que su formación puede reflejar un mecanismo para atrapar la gran cantidad de proteínas parcialmente desnaturalizadas que se producen en una situación grave de estrés, cuando se supera la capacidad de plegamiento de otras chaperonas (Löw *et al.*, 2000).

I.4.5.2. Síntesis de sHSPs en plantas

Las sHSPs de plantas deben cumplir funciones biológicas muy importantes ya que son sintetizadas tanto en variadas situaciones de estrés como en determinadas etapas del desarrollo y de la diferenciación celular. Algunas sHSPs se expresan sólo en respuesta al estrés, otras sólo durante el desarrollo y otras en ambas situaciones (Volkov *et al.*, 2005).

I.4.5.2.1. Síntesis de sHSPs en situaciones de estrés

Bajo condiciones normales de crecimiento, la mayoría de las sHSPs no se detectan en tejidos vegetales, pero se sintetizan rápidamente en respuesta al calor. Incrementos de temperatura de 10-15 °C sobre la temperatura óptima de crecimiento inducen la respuesta celular al choque térmico, siendo la acumulación de las sHSPs proporcional al aumento de la temperatura y a la duración del estrés (Waters *et al.*, 1996). Se ha observado que las sHSPs son bastante estables, con una vida media de 52±12 horas después del estrés, lo que sugiere que la función de estas proteínas es crítica durante el periodo de estrés y durante el periodo de recuperación (Chen *et al.*, 1990).

El choque térmico no es el único estímulo que desencadena la expresión de los genes de sHSPs. Algunas sHSPs se acumulan en respuesta al estrés osmótico: la expresión de los genes de HaHSP17.9 (Clase II) y HaHSP17.6 (Clase I) es inducida por estrés osmótico en girasol (Almoguera *et al.*, 1993), mientras que los genes que codifican las sHSPs de clase II en *Arabidopsis thaliana* (AtHSP17.6A) se expresan por estrés térmico y por estrés osmótico (Sun *et al.*, 2001). Hamilton *et al.* (2001) demostraron que las sHSPs mitocondriales protegen al Complejo I de la cadena de transporte de electrones durante el estrés osmótico.

Otras sHSPs se acumulan en respuesta al estrés oxidativo: la expresión en arroz de la OsHSP26 (Clase P) se incrementa en respuesta al tratamiento con metilviolágeno y con H₂O₂ (Lee *et al.*, 2000), la expresión de la HSP22 (Clase M) en respuesta al estrés oxidativo se ha observado en cultivos celulares de tomate (Banzet *et al.*, 1998), otras sHSPs de perejil se inducen por el estrés oxidativo causado por el ozono (Eckey-Kaltenbach *et al.*, 1997) y la QsHSP10.4 (Clase CI) de alcornoque se expresa en respuesta al estrés oxidativo endógeno y exógeno

(Jofré *et al.*, 2003). El estrés oxidativo es crucial para las plantas ya que la mayoría de las condiciones ambientales estresantes conducen a la generación de especies reactivas de oxígeno. El efecto protector de las sHSPs frente al estrés oxidativo ha sido demostrado mediante expresión heteróloga en bacterias (Jofré *et al.*, 2003) y sobreexpresando la proteína en plantas de *Arabidopsis* (Härndahal *et al.*, 1999).

Las bajas temperaturas también inducen la síntesis de sHSPs. La expresión de la CsHSP17.5 (Clase CI) en castaño se incrementa durante el invierno y alcanza los niveles más altos durante el periodo más frío del año, de noviembre a marzo (López-Matas *et al.*, 2004). Además de en el castaño, la asociación de la síntesis de sHSPs con la aclimatación al frío ha sido descrita en otras especies de árboles, la WAP20 (Clase ER) se acumula durante el invierno en árboles de moreras (Ukaji *et al.*, 1999) y lo mismo ocurre con otras sHSPs que se acumulan en ramas de *Acer platanoides*, *Sambucus nigra* y *Aristolochia macrophyla* (Lubaretz *et al.*, 2002). La expresión de sHSPs en tomate (Sabehat *et al.*, 1998; Kadyrzhanova *et al.*, 1998) y pomelo (Rozenvieg *et al.*, 2004) se induce a bajas temperaturas, pero sólo si los frutos se someten a un calentamiento previo, existiendo además correlación entre la expresión de estos genes y la tolerancia a las bajas temperaturas por protección frente a daños por frío. En otros casos, la expresión de sHSPs a bajas temperaturas se induce por un tratamiento previo con ácido jasmónico y ácido salicílico (Ding *et al.*, 2001). El efecto crioprotector de las sHSPs ha sido demostrado mediante estudios *in vitro* (López-Matas *et al.*, 2004) y además, la expresión heteróloga de la proteína CsHSP17.5 de castaño en *E. coli* incrementa la viabilidad de los cultivos bacterianos a temperaturas extremas, tanto altas como bajas (Soto *et al.*, 1999).

La presencia de metales pesados induce también la expresión de algunas sHSPs: la transcripción del gen de la MSHSP18 de alfalfa se incrementa por el tratamiento con CdCl_2 , además de por las elevadas temperaturas y por choque osmótico (Györgyey *et al.*, 1991), las sHSPs cloroplastídicas de maíz se inducen en respuesta a la existencia de Cu, Ni, Pb y Zn hasta niveles comparables a los que se alcanzan por estrés térmico (Heckathorn *et al.*, 2004) y la HvHSP17 (clase CI) de cebada se induce en presencia de cadmio (Gullì *et al.*, 2005). El papel que ejercen las sHSPs durante el estrés por metales es desconocido pero se cree que las sHSPs pueden proteger a las proteínas y a las membranas celulares ya que son los primeros sitios de daño celular durante este tipo de estrés (Hall, 2002).

Estas observaciones indican que las sHSPs tienen un papel protector no sólo frente a las altas temperaturas sino frente a una gran variedad de estreses abióticos.

I.4.5.2.2. Síntesis de sHSPs en ausencia de estrés

En ausencia de estrés ambiental, la síntesis de sHSPs está restringida a ciertos estados de desarrollo como la embriogénesis (Almoguera *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 2001; Coca *et al.*, 1994; Carranco *et al.*, 1997), la germinación (Wehmeyer *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2001; Kruse *et al.*, 1993; Puigderrajols *et al.*, 2002), el desarrollo del polen (Bouchard, 1990; Dietrich *et al.*, 1991; Zarsky *et al.*, 1995; Volkov *et al.*, 2005) y la maduración del fruto (Löw *et al.*, 2000; Lawrence *et al.*, 1997; Neta-Sharir *et al.*, 2005; Medina-Escobar *et al.*, 1998). La inducción de sHSPs durante el desarrollo generalmente implica la síntesis de un solo tipo de sHSPs, lo que apoya la idea de que existen diferencias funcionales entre las distintas clases de sHSPs e incluso entre proteínas de una misma clase (Waters *et al.*, 1996).

Los casos mejor caracterizados de regulación por el desarrollo son la expresión de sHSPs durante el desarrollo del polen y la maduración de la semilla. Se han encontrado proteínas o mRNAs de sHSPs citosólicas en una gran variedad de semillas (Hernández y Vierling, 1993; Coca *et al.*, 1994; DeRocher y Vierling, 1994; Wehmeyer *et al.*, 1996; Collada *et al.*, 1997; Treglia *et al.*, 1999; Schubert *et al.*, 2002) y en polen de distintas especies (Dietrich *et al.*, 1991; Hopf *et al.*, 1992; Atkinson *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 1994; Volkov *et al.*, 2005). La expresión de sHSPs durante el desarrollo de la semilla es transitoria, las sHSPs empiezan a acumularse en la fase intermedia y son abundantes al final de la maduración y en semillas secas (Wehmeyer *et al.*, 1996; Puigderrajols *et al.*, 2002). Durante la germinación, las sHSPs son abundantes durante los primeros días pero después su concentración disminuye rápidamente (Wehmeyer y Vierling, 2000).

La especificidad en la regulación de la expresión de sHSPs citosólicas en respuesta al estrés y durante el desarrollo sugiere que pueden tener funciones distintas en cada situación (Waters *et al.*, 1996). El papel de las sHSPs citosólicas inducidas por el desarrollo es aún desconocido. Se ha propuesto que la síntesis de sHSPs durante la maduración de la semilla puede deberse a que ejerzan funciones importantes en la adquisición de dormancia y en la protección de los componentes celulares frente a la desecación (Wehmeyer y Vierling, 2000). Consistente con esta última hipótesis, se ha mostrado que algunas sHSPs de girasol se sintetizan en respuesta al déficit de agua. Sin embargo, también se ha descrito que un tipo mutante de *Arabidopsis* (*abi 3-1*), que es tolerante a la desecación, tiene niveles de sHSPs 10 veces menores que el tipo salvaje, lo que sugiere que las sHSPs no son imprescindibles para la tolerancia a la desecación o que pueden funcionar a concentraciones significativamente reducidas (Coca *et al.*, 1994). Además, la

presencia de altas concentraciones de sHSPs en semillas de castaño no es suficiente para conferirles tolerancia a la desecación (Collada *et al.*, 1997).

Además de en el polen y en la semilla, también se han encontrado sHSPs constitutivas en órganos vegetativos, aunque en estos órganos las sHSPs se localizan sólo en los tejidos que contienen gran concentración de proteínas de reserva como bulbos, tubérculos y ramas de árboles y arbustos durante la dormancia (Lubaretz *et al.*, 2002). En general, las proteínas de reserva se encuentran en vacuolas de almacenamiento y se cree que la presencia de sHSPs puede protegerlas de la proteólisis inespecífica, quizás porque las sHSPs pueden actuar como inhibidores de proteasas (Lubaretz *et al.*, 2002).

Se ha descrito la expresión de sHSPs citosólicas durante la maduración del fruto (Sabehat *et al.*, 1998; Fray *et al.*, 1990; Medina-Escobar *et al.*, 1998; Ding *et al.*, 2001). El papel de estas sHSPs es aún desconocido, pero el hecho de que las sHSPs se expresen justo antes del comienzo de la maduración sugiere que desempeñan un papel importante para desencadenar este proceso, quizás relacionado con la activación y/o desactivación de proteínas relevantes (Medina-Escobar *et al.*, 1998). Además de las sHSPs citosólicas, durante la maduración del fruto también se expresan sHSPs cloroplastídicas (Lawrence *et al.*, 1997; Neta-Sharir *et al.*, 2005). Esta clase de sHSPs puede actuar en la conversión de cloroplastos a cromoplastos durante la maduración (Neta-Sharir *et al.*, 2005), además de proteger del estrés oxidativo que se produce durante el desarrollo del cromoplasto (Lawrence *et al.*, 1997).

I.4.5.3. Regulación de la expresión de sHSPs

El mecanismo básico de inducción de los genes de sHSPs está conservado entre todos los eucariotas (Waters *et al.*, 1996). Existe un conjunto de elementos génicos que actúan en *cis* y regulan la expresión de estos genes por interacción con diferentes factores de transcripción. Los elementos de respuesta al choque térmico (HSEs) están muy conservados en eucariotas (Bienz y Pelma, 1987; Nover y Scharf, 1997) y se requieren para la respuesta al estrés y para la expresión de sHSPs en embriones (Coca *et al.*, 1996; Prändl *et al.*, 1995). Los HSEs se extienden en la región 5' cercana a la caja TATA ocupando unos cientos de pares de bases. La secuencia consenso en eucariotas consiste en unidades alternas, contiguas e invertidas, de una secuencia de cinco pares de bases definida como nGAAn (Amin *et al.*, 1988; Xiao *et al.*, 1988). En plantas, la secuencia consenso óptima del HSE es 5'-AGAAG-3' (Barros *et al.*, 1992). Son necesarias al menos tres unidades de este motivo secuencial para la unión eficiente de los HSFs al DNA, resultando secuencias del tipo 5'-nGAAnnTTCnnGAAn-3' (Schöffl *et al.*, 1998).

Además, existen otros elementos reguladores que participan en la expresión de los genes de choque térmico. En plantas son los elementos CCAAT, determinadas secuencias ricas en AT y varias regiones accesorias (Czarnecka *et al.*, 1989; Rieping and Schöffl, 1992). En el promotor de los genes de sHSPs inducidos por metales pesados se han encontrado secuencias similares al elemento de respuesta a metales (MRE) de mamíferos (Czarnecka *et al.*, 1985; Czarnecka *et al.*, 1988; Gullì *et al.*, 2005). El motivo MRE es esencial para la inducción del gen de la metalotioneína humana por cadmio, a si que por analogía, este motivo puede ser responsable de la expresión de sHSPs en plantas en presencia de metales pesados (Czarnecka *et al.*, 1985).

Todos estos elementos génicos constituyen lugares en los que diferentes factores de transcripción pueden interaccionar con el DNA regulando su expresión. Estas proteínas incluyen a los factores de transcripción de choque térmico (HSFs), que interaccionan con los HSEs (Nover *et al.*, 2001), a las proteínas de unión al potenciador CCAAT (C/EBPs), que son factores de transcripción con dominios de cremallera de leucina (Ramji y Foka, 2002), y a los factores de unión a secuencias ricas en AT (ATBFs) que se unen a las proteínas de andamiaje que modifican la estructura de la cromatina (Czarnecka-Verner *et al.*, 1998). La unión de estos factores de transcripción específicos facilita la interacción de factores de transcripción generales, como el factor de unión a la caja TATA (TBP), lo que es un prerequisite para la subsiguiente unión del complejo basal de transcripción (Pugh, 1996; Schöffl *et al.*, 1998).

Los HSFs son los componentes terminales de las cadenas de transducción de señales de membrana que inducen la respuesta al estrés en las células (Wu, 1995; Nover *et al.*, 1996; 2001; Morimoto, 1998; Scharf *et al.*, 1998; Nakai, 1999). La clonación inicial de un HSF de levadura (Sorger y Pelham, 1988) fue seguida de la clonación de otros HSFs en *Drosophila* (Clos *et al.*, 1990), en el hombre (Rabindran *et al.*, 1991) y en tomate (Sharf *et al.*, 1990). Las plantas son los eucariotas con mayor número de HSFs (Almoguera *et al.*, 2002; Nover *et al.*, 2001; Baniwal *et al.*, 2004), la multiplicidad y divergencia de sHSFs puede reflejar una especialización funcional única de plantas (Czarnecka *et al.*, 2000; Almoguera *et al.*, 2002).

De estructura similar a otros factores de transcripción, los HSFs tienen una organización modular con un dominio de unión a DNA (DBD), que incluye un motivo estructural hélice-giro hélice requerido para la interacción con los HSEs (Vuister *et al.*, 1994; Schulteiss *et al.*, 1996), un dominio de oligomerización (HR-

A/B) compuesto de repeticiones hidrofóbicas que permiten la formación de trímeros, un dominio de localización nuclear (NLS) compuesto de aminoácidos básicos y, en la mayoría, un dominio de activación (CTAD) rico en aminoácidos aromáticos, hidrofóbicos y ácidos (motivos AHA) (Döring *et al.*, 2000; Lohman *et al.*, 2004) (Figura I.3A). En función de la secuencia de estos dominios y de las zonas de unión entre ellos, los HSFs de plantas se clasifican en tres clases: A, B y C (Nover *et al.*, 2001; Lohman *et al.*, 2004).

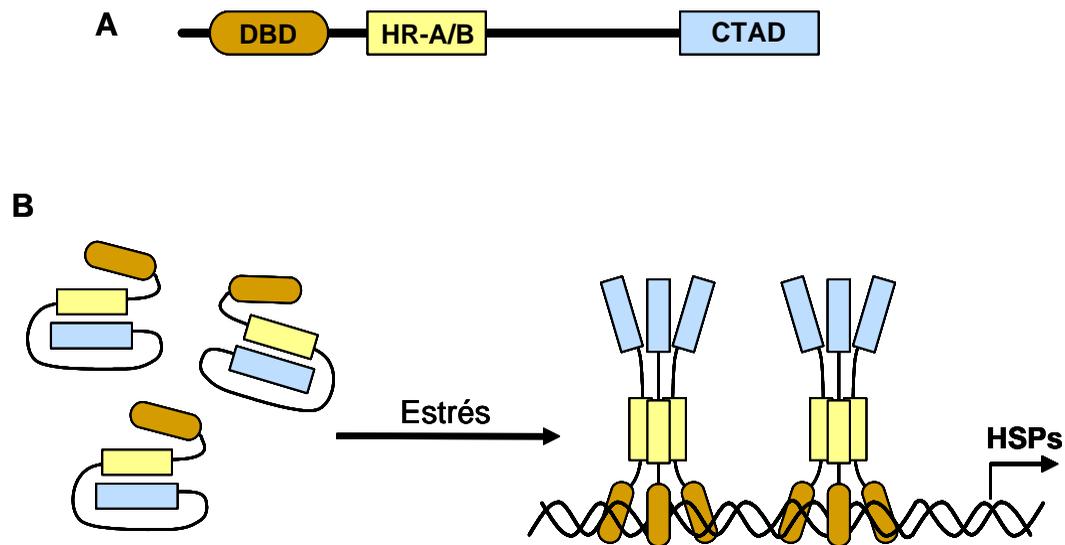


Figura I.3. A. Estructura general de HSF. B. Activación y trimerización de HSF (Morimoto, 1998).

La síntesis de la mayor parte de los HSFs no está regulada por la temperatura, sino que, en ausencia de estrés el factor de transcripción de choque térmico está presente en el citosol en una forma monomérica inactiva. Bajo condiciones de estrés, el HSF se vuelve activo por la polimerización de los monómeros, que se agrupan en trímeros, translocándose al núcleo gracias a las

secuencias de localización nuclear (Zandi *et al.*, 1997) e incrementando su afinidad de unión al DNA (Schöffl *et al.*, 1998) (Figura I.3B). Una característica única de plantas es la existencia de HSFs inducibles por calor (Nover *et al.*, 1996; Lohman *et al.*, 2004), sugiriendo un mecanismo de varios pasos en la inducción de la respuesta al estrés mediada por los HSFs (Nover *et al.*, 1996). Los HSFs inducibles por calor pueden actuar como co-activadores de la expresión génica durante el estrés térmico prolongado o durante el periodo de recuperación (Lohman *et al.*, 2004). La interacción de los HSFs con las secuencias HSEs, junto a la unión de otros factores a los demás elementos génicos reguladores, produce la inducción completa de los genes de las proteínas de estrés.

Aunque se conoce poco de las funciones de las distintas clases de HSFs, los modelos actuales sugieren que la respuesta al choque térmico está controlada por la interacción entre dos clases de HSFs: los HSFs de clase A que funcionan como activadores y los HSFs de clase B que reprimen o atenúan la respuesta (Czarnecka *et al.*, 2000; 2004). La existencia de una clase de HSFs que pueden inhibir la transcripción parece ser un fenómeno único de plantas (Czarnecka *et al.*, 2004).

La inducción de la expresión como respuesta al estrés se inhibe por las propias HSPs que se sintetizan, principalmente por las HSP 70 (Morimoto 1998; Lee *et al.*, 1996). La unión de la HSP 70 a los HSFs impide la trimerización y, por lo tanto, la unión de los HSFs a los HSEs, bloqueando la transcripción de los genes de estrés (Kim *et al.*, 2002). Además de por las HSP 70, la actividad de los HSFs también se regula por fosforilación/desfosforilación. Se ha descrito que la fosforilación de los HSFs disminuye la unión a los HSEs (Schöffl *et al.*, 1998). Por el contrario, el ácido salicílico estabiliza los trímeros de HSFs, favoreciendo la unión a los HSEs (Larkindale *et al.*, 2002).

Se ha descrito que en bacterias la regulación de la expresión de HSPs puede ocurrir también durante el procesamiento postranscripcional (Ron *et al.*, 1999). Otros niveles de regulación en plantas deben ser estudiados.

Como ya se ha comentado, los genes de choque térmico no sólo se expresan en respuesta al estrés sino también durante determinados procesos de desarrollo, aún en ausencia de cambios significativos de temperatura. No todos los genes de sHSPs activados por estrés térmico se expresan durante el desarrollo (Coca *et al.*, 1996) y algunos de los genes de sHSPs expresados durante la embriogénesis no son inducibles por estrés térmico (Carranco *et al.*, 1997). Esta diversidad de HSPs inducidas por estrés y por el desarrollo sugiere que existe especificidad en la regulación de los genes de HSPs.

En plantas, durante la maduración de la semilla, la activación de la síntesis de sHSPs implica al menos 2 mecanismos reguladores distintos. Uno, observado en el último estado de la embriogénesis que coincide con la desecación de la semilla, es dependiente de HSEs y presumiblemente mediado por los HSFs, porque mutaciones en el HSE reducen la capacidad de unión del HSF y consecuentemente de activación del promotor durante el desarrollo (Almoguera *et al.*, 1998; Carranco *et al.*, 1997). El otro, observado en el primer estado de la embriogénesis, no es dependiente de los HSEs ya que la activación de la expresión no se ve afectada por mutaciones que impiden la unión de los HSFs, sugiriendo que en este caso la expresión de los genes de HSPs está regulada por otros activadores *trans*, dependientes del desarrollo (Carranco *et al.*, 1997).

Los promotores de los genes de sHSPs que se expresan en el desarrollo contienen HSEs imperfectos (Carranco *et al.*, 1997; 1999) y otros elementos génicos reguladores que activan o inhiben al promotor (Carranco *et al.*, 1999). Se

han encontrado HSFs específicos del desarrollo, por ejemplo el HaHSFA9, que se sintetiza solo en embriones y desaparece después de la germinación, activa preferentemente a promotores con HSEs imperfectos (Almoguera *et al.*, 2002).

Durante el desarrollo actúan también otros factores de transcripción específicos como FUS3, LEC1 Y ABI3 (Wehmeyer y Vierling, 2000). Se ha demostrado que las mutaciones de *abi3* afectan a la expresión y acumulación de varias sHSPs en *Arabidopsis thaliana*, parece ser porque ABI3 funciona acoplado a HSFs (Rojas *et al.*, 1999). Los elementos reconocidos por estos factores de transcripción no se han definido, pero FUS3 y ABI3 tienen dominios B3 que reconocen a los motivos CACCTG encontrados en el promotor de algunas sHSPs que se expresan durante el desarrollo (Wehmeyer y Vierling, 2000).

Recientemente se ha descrito un nuevo factor de transcripción implicado en la expresión de sHSPs durante el desarrollo, el HaDREB2 (sunflower Drought-Responsive Element Binding factor 2). HaDREB2 es un factor de transcripción de la familia AP2 que actúa de forma sinérgica con HaHSFA9 (Díaz-Martín *et al.*, 2005).

I.4.5.4. Función de las sHSPs

La síntesis y acumulación de las sHSPs en respuesta al estrés ambiental y a estímulos del desarrollo se ha relacionado con la tolerancia al estrés (Sun *et al.*, 2002). El mecanismo por el cual las sHSPs ejercen esta protección celular es desconocido, pero el hecho de que otras HSPs como las HSP70, HSP60, HSP90 y HSP100 actúen como chaperonas moleculares indica la posibilidad de que las sHSPs podrían también actuar de esta forma (Waters *et al.*, 1996).

Las chaperonas moleculares son proteínas que se unen y estabilizan a conformeros inestables de otras proteínas y, controlando su unión y liberación, facilitan su correcta localización subcelular *in vivo*, su plegamiento, la unión de oligómeros, el transporte a compartimentos subcelulares e incluso su destrucción por degradación (Hendrick *et al.*, 1995).

La evaluación de la actividad chaperona *in vitro* de las sHSPs principalmente se realiza comparando el grado de agregación, la inactivación de las funciones enzimáticas y/o la tasa de plegamiento de proteínas sustrato en presencia y ausencia de sHSPs (Sun *et al.*, 2002). Mediante estos estudios *in vitro* se demostró que muchas sHSPs citosólicas (Lee *et al.*, 1995, Collada *et al.*, 1997) y mitocondriales (Shono *et al.*, 2002) pueden actuar como chaperonas moleculares. Se ha observado que estas proteínas tienen capacidad para modificar las propiedades de plegamiento y agregación de distintos sustratos modelo y que la adición de cantidades estequiométricas de sHSPs aumenta el plegamiento de algunas proteínas químicamente desnaturalizadas, como de la citrato sintasa (CS) y de la lactato deshidrogenasa (LDH), mediante un mecanismo independiente de ATP. Por otra parte, las sHSPs también previenen la agregación de la CS y de la LDH por calor, lo que proporciona más evidencias de su papel en la termotolerancia. Las sHSPs previenen la inactivación de la CS únicamente cuando están presentes durante la desnaturalización térmica, momento en que es más probable que ocurra el plegamiento erróneo de las proteínas y su agregación (Lee *et al.*, 1995). Por otra parte, se ha demostrado la interacción física de sHSPs con otras proteínas solubles de soja (Jinn *et al.*, 1995). Mediante estudios *in vitro* también se ha demostrado el efecto crioprotector de las sHSPs, por ejemplo la CsHSP17.5 de castaño previene la inactivación por frío de la LDH, proporcionando nuevos datos sobre la importancia de las sHSPs en la protección frente a las bajas temperaturas (López-Matas *et al.*, 2004).

Los estudios *in vitro* se han complementado con distintos estudios *in vivo*. Se han usado células de *Arabidopsis* genéticamente modificadas para que expresen niveles elevados de luciferasa, una proteína fácilmente detectable. La actividad chaperona de las sHSPs se demostró por la protección y reactivación de la luciferasa (Forreiter *et al.*, 1997; Löw *et al.*, 2000), el proceso de renaturalización de la luciferasa necesita HSP 70 y ATP (Forreiter *et al.*, 1997; Lee y Vierling, 2000). Otros estudios han demostrado la actividad chaperona *in vivo* de las sHSPs mediante expresión heteróloga en bacterias (Yeh *et al.*, 1997; Soto *et al.*, 1999; Joe *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 2005). La expresión de distintas sHSPs en *Escherichia coli* protege a la mayoría de las proteínas de la bacteria frente a la agregación por incremento de la temperatura. Además, las bacterias que expresan la sHSP presentan mayor viabilidad a temperaturas superiores e inferiores a la temperatura normal de crecimiento (Soto *et al.*, 1999).

Basándose en los estudios *in vitro* e *in vivo*, se ha propuesto un modelo para explicar el mecanismo de acción de las sHSPs. Después de la exposición de las células a elevadas temperaturas, se acumulan en el citoplasma una gran cantidad de proteínas parcialmente desnaturalizadas, las sHSPs actúan uniéndose a estas proteínas mediante un mecanismo independiente de ATP. Se cree que las sHSPs constituyen un importante reservorio de proteínas desnaturalizadas ya que presentan mayor afinidad de unión por los sustratos en comparación con otras chaperonas y que algunas sHSPs se acumulan en grandes concentraciones después del estrés (Lee *et al.*, 1997; Ehrnsperger *et al.*, 1997; Lee y Vierling, 2000). En eucariotas, las proteínas sustrato unidas a las sHSPs son transferidas a otras chaperonas, como las HSPs 70, que las pliegan por un mecanismo dependiente de ATP. No está claro si la transferencia del sustrato a otras chaperonas es un proceso activo (Lee y Vierling, 2000). Un destino adicional de los sustratos unidos a las sHSPs es la proteólisis, ya que el mantenimiento de los sustratos en

una conformación no plegada puede facilitar su procesamiento proteolítico (Waters *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 1997) (Figura I.4).

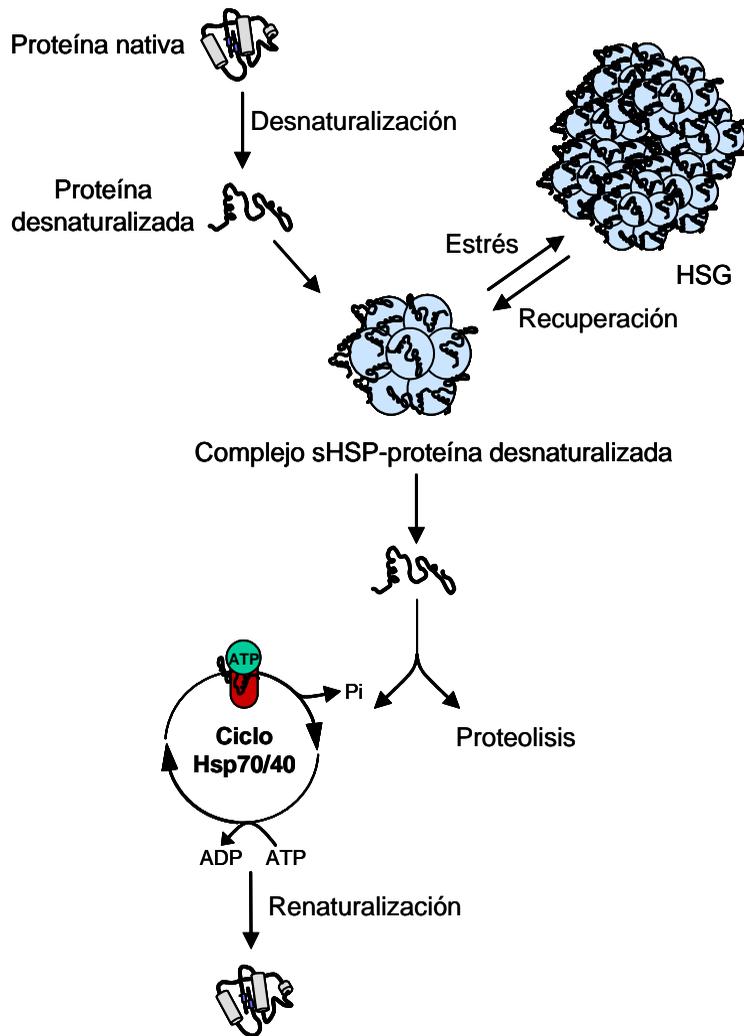


Figura I.4. Modelo del mecanismo de acción de las sHSPs (Löv *et al.*, 2000).

Cuando el estrés térmico es continuo, la cantidad de proteínas desnaturalizadas en el citoplasma llega a estar por encima de la capacidad de plegamiento de las chaperonas pero, posiblemente, las proteínas sustrato se mantienen unidas a las sHSPs, formando complejos que son almacenados transitoriamente como gránulos de choque térmico (HSGs), que se desintegran después durante el periodo de recuperación (Löw *et al.*, 2000) (Figura I.4). Las sHSPs mantienen así a las proteínas desnaturalizadas, en un estado competente para su renaturalización por otras chaperonas previniendo la inactivación térmica irreversible (Lee *et al.*, 1997; Ehrnsperger *et al.*, 1997; Lee y Vierling, 2000). Con la formación de HSGs, las sHSPs se colocan con las HSPs 70, haciendo más eficiente la cooperación entre los dos tipos de chaperonas (Sun *et al.*, 2002).

El mecanismo de unión al sustrato de las sHSPs está basado en un cambio en el perfil de hidrofobicidad de las sHSPs en condiciones de estrés (Haslbeck, 2002). A temperaturas normales, las superficies hidrofóbicas de las sHSPs, que podrían actuar como sitios de unión a sustratos, están enterrados en la estructura oligomérica de las sHSPs (Van Montfort *et al.*, 2001; Haslbeck *et al.*, 2005; Basha *et al.*, 2006). Como consecuencia del incremento de la temperatura, se producen cambios conformacionales en las sHSPs que llevan a la disociación del complejo oligomérico, exponiéndose los sitios de unión al sustrato y resultando en la formación de los complejos sHSP-sustrato (Lee *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2004; Basha *et al.*, 2006). Como se describió anteriormente, para la unión del sustrato a las sHSPs son esenciales dos dominios: el consenso II, que contiene residuos muy conservados en todas las sHSPs, principalmente la región Glu-Glu/Asp-X₂-Val-Leu, y las regiones hidrofóbicas del dominio amino terminal (Lee *et al.*, 1997; Yeh *et al.*, 2002; Basha *et al.*, 2006). La diversidad de secuencia del extremo amino de las sHSPs permite la unión a una amplia variedad de proteínas.

Los cambios conformacionales de las sHSPs no sólo dependen del incremento de la temperatura. La conformación de la HSP25.3 (clase P) de *Arabidopsis* cambia, cuando es sometida *in vitro* tanto a estrés térmico como a estrés oxidativo (Härndahl *et al.*, 1999), un cambio causado por la sulfoxidación de metioninas en el dominio conservado rico en metionina. Otros estudios *in vitro* demuestran que la sulfoxidación de metioninas de la HSP21 de *Arabidopsis thaliana* hace que se pierda la actividad chaperona de esta proteína (Sundby *et al.*, 2005), por lo que se ha sugerido que la presencia de estas metioninas puede proporcionar a esta sHSP una fuerte dependencia del estado redox del cloroplasto para su actividad (Härndahl *et al.*, 2001).

Se ha demostrado que las sHSPs localizadas en el cloroplasto protegen al fotosistema II, y como consecuencia a todo el sistema de transporte de electrones, durante el estrés térmico (Heckathorn *et al.*, 1998), el estrés oxidativo (Lee *et al.*, 2000; Neta-Sharir *et al.*, 2005) y el estrés por la presencia de metales pesados (Heckathorn *et al.*, 2004). Este efecto protector es ejercido por el dominio rico en metionina característico de las sHSPs cloroplastídicas, ya que la adición de anticuerpos frente a esta región disminuye la tasa de transporte de electrones (Heckathorn *et al.*, 1998). Así mismo, las sHSPs mitocondriales protegen al complejo I (NADH: ubiquinona oxirreductasa) de la cadena de transporte de electrones durante el estrés térmico (Downs *et al.*, 1998), el estrés oxidativo (Downs *et al.*, 1999) y el estrés osmótico (Hamilton *et al.*, 2001). Estos estudios demuestran que las sHSPs desempeñan un papel muy importante en la tolerancia al estrés de los mecanismos de transporte de electrones para la generación de energía.

El efecto protector de las sHSPs no se debe solo a su función como chaperonas, también se debe a su actividad como estabilizadoras de la estructura

de las membranas (Vigh *et al.*, 1998; Török *et al.*, 2001; Tsvetkova *et al.*, 2002). Las bajas temperaturas producen una disminución de la fluidez de las membranas que pasan a adquirir estructura de gel ordenado, mientras que por el contrario el incremento de la temperatura aumenta la fluidez de las membranas, que pasan a estado de cristal líquido. Ambos efectos pueden producir grandes daños en la célula. Se ha descrito que las sHSPs se asocian con los lípidos de las membranas y modifican sus propiedades, incrementando la fluidez en el estado de gel, produciendo un efecto protector a bajas temperaturas, y aumentando la rigidez en el estado de cristal líquido, protegiendo así frente a las temperaturas elevadas (Tsvetkova *et al.*, 2002). Este efecto estabilizador de las sHSPs se ejerce en las primeras fases del estrés porque posteriormente ya no es tan necesario ya que las células se adaptan al estrés modificando la composición lipídica de las membranas (Török *et al.*, 2001; Tsvetkova *et al.*, 2002).

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

La chirimoya es un fruto subtropical cuya comercialización está dificultada por la rápida maduración que sufre el fruto tras la recolección, lo que le lleva a alcanzar la senescencia, y con ello la pérdida de sus excelentes cualidades organolépticas, en un período de tiempo tan corto como cinco o seis días. A esta característica adversa se añade el hecho de que la chirimoya es uno de los frutos que no puede ser conservado a bajas temperaturas, con el fin de retrasar el proceso de maduración, porque se daña irreversiblemente si se almacena por debajo de los 10 °C, sufriendo lo que se conoce como “daños por frío”.

Muchos estudios han demostrado la existencia en plantas de resistencia cruzada a diferentes condiciones de estrés. La exposición de la planta a un estrés moderado no solo induce resistencia a este tipo de estrés, sino que también protege a la planta frente a otros tipos de estrés (Sabehat *et al.*, 1998b; Gong *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2003). Se han propuesto varios mecanismos para explicar este fenómeno, muchos de ellos se basan en el papel de las proteínas de estrés (HSP). Como consecuencia del estrés se induce la expresión de estas proteínas que van a reparar el daño sufrido por la célula y van a conferir resistencia frente a otra situación de estrés.

Se ha descrito en distintos frutos, que la aplicación de distintos tratamientos produce la inducción de proteínas de estrés que posibilitan la conservación de los frutos a bajas temperaturas (Sabehat *et al.*, 1998; Rozenvieg *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Sapitnitskaya *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). La hipótesis de este trabajo es que al igual que en otros frutos, la inducción de proteínas de estrés en chirimoya podría proteger a los frutos frente a los daños por frío que se producen como consecuencia de su conservación a bajas temperaturas,

lo que permitiría modificar las condiciones actuales de almacenamiento de los frutos y de esta forma alargar y controlar su vida comercial retrasando la senescencia.

Nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1- Conseguir un método de tratamiento de los frutos que induzca proteínas de estrés, en concreto proteínas de choque térmico de bajo peso molecular (sHSPs), y que al mismo tiempo determine algún tipo de protección frente a las bajas temperaturas o que produzca un retraso en la senescencia.
- 2- Estudiar el efecto que produce dicho tratamiento sobre la maduración posterior y sobre el contenido de proteínas.
- 3- Identificar y caracterizar las proteínas inducidas para comprobar que se trata de proteínas de estrés.
- 4- Identificación de genes que codifican para sHSPs de chirimoya.
- 5- Expresar las sHSPs de chirimoya en bacterias y estudiar su efecto protector frente a distintos tipos de estrés.
- 6- Expresar las sHSPs de chirimoya en plantas y estudiar su efecto protector frente a las bajas temperaturas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1. MATERIALES

Los materiales y reactivos utilizados en la tesis fueron suministrados por las casas comerciales Sigma-Aldrich, Merck, Bio-Rad, Amersham, Scharlau, Fluka, Panreac, Novagen, Qiagen, Eppendorf, Millipore, MBL, Macherey-Nagel, Fermentas y New England Biolabs.

III.2. MÉTODOS

III.2.1. Tratamientos de los frutos y estudio de la maduración.

III.2.1.1. Frutos

Todos los experimentos se han realizado con frutos de chirimoyo (*Annona cherimola* Mill.) variedad Fino de Jete, procedentes de Motril (Granada).

Los frutos se recogieron manualmente cuando alcanzaron el momento adecuado en su desarrollo fisiológico.

III.2.1.2. Tratamiento de los frutos

Las chirimoyas se recolectaron y se llevaron inmediatamente al laboratorio donde fueron sometidos a diferentes tratamientos.

Se realizó un primer tratamiento en el que los frutos se almacenaron durante 18 horas en frascos de cristalización por los que se hacía pasar un flujo constante de una mezcla de CO₂ y aire en proporciones de CO₂ al 30 %, 50 %, 75 % y 100 %. Posteriormente, se almacenaron durante tres días a 8 °C y después se mantuvieron durante cinco días a 20 °C para inducir la senescencia.

En el segundo tratamiento, los frutos se almacenaron durante cuatro días a 8 °C en cuatro atmósferas sintéticas diferentes con O₂ al 18 % en todos los casos y CO₂ al 10 %, 15 %, 20 % y 25 %, se completó la atmósfera con N₂ al 72 %, 67 %, 62 % y 57 % respectivamente. Transcurrido este tiempo los frutos se almacenaron durante seis días a 20 °C para inducir la senescencia.

En ambos casos, se prepararon dos lotes de frutos para utilizarlos de referencia. Un lote se conservó a 8 °C en aire como condición control del tratamiento con CO₂ y otro lote se mantuvo a 20 °C en aire como condición control también con respecto a la temperatura.

Para los experimentos de marcaje de proteínas, después de la recolección las chirimoyas se inyectaron con [³⁵S]-metionina en una zona del mesocarpio y se almacenaron durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente se mantuvieron a 20 °C para permitir la senescencia de los frutos.

Periódicamente durante los tratamientos, se tomaron muestras de mesocarpio de dos frutos de cada condición para su análisis posterior. Se cortaron trozos de mesocarpio de diferentes zonas del fruto procurando realizar cortes limpios que no produjeran el aplastamiento del tejido. Inmediatamente tras el corte, para evitar la oxidación de los polifenoles, las muestras de mesocarpio se congelaron a -80 °C hasta su uso.

La Figura III.1 recoge esquemáticamente la distribución de tiempo de los tratamientos realizados.

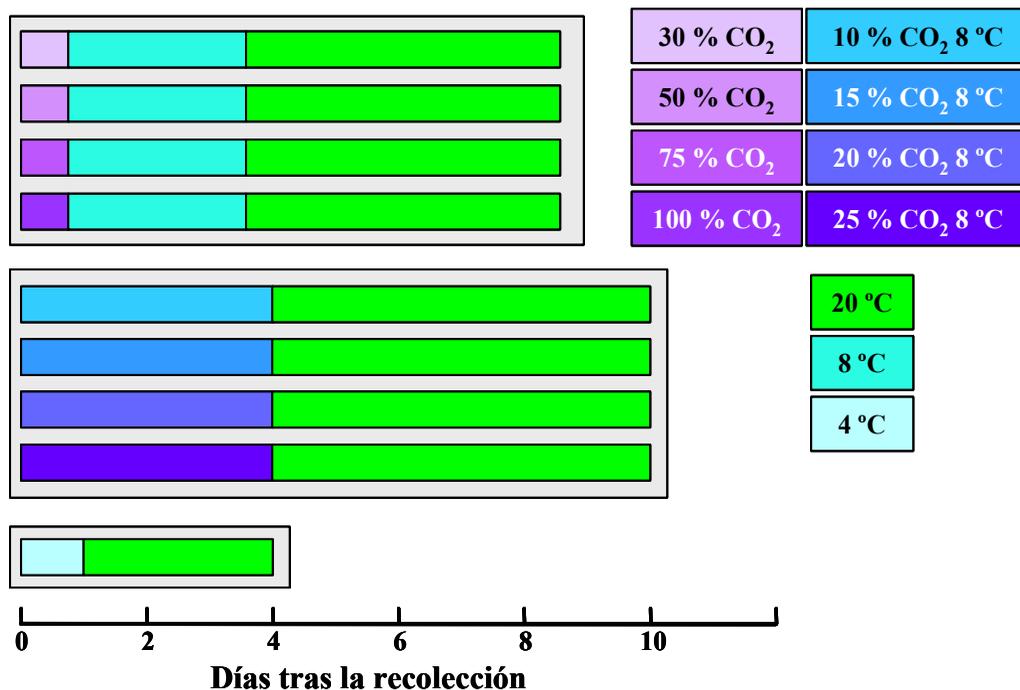


Figura III.1. Esquema de la distribución de tiempo de los tratamientos realizados a los frutos y de las condiciones de almacenamiento posterior. Se indican las temperaturas y los porcentajes de CO₂ a que fueron sometidos.

III.2.1.3. Preparación de mesocarpio para extractos

Los fragmentos de mesocarpio de chirimoya congelados a -80 °C se trituraron en un molinillo eléctrico de cuchillas con aproximadamente la misma cantidad de nieve carbónica para que no hubiera descongelación en el proceso de trituración. El polvo se recogió en tubos de 50 mL y se guardó a -80 °C con la

tapadera abierta hasta que la nieve carbónica se evaporó. El polvo se conservó a -80 °C hasta su utilización.

III.2.1.4. Determinación del contenido total de sólidos solubles

La determinación del contenido total de sólidos solubles (SST) de cada fruto se realizó en el momento de la toma de muestras de mesocarpio para conservarlas. Se hizo un corte longitudinal al fruto e inmediatamente se rascó con la punta de un cuchillo en la zona del ecuador del mesocarpio hasta formar una papilla que se transfirió a un tubo eppendorf. Era fundamental operar rápidamente, pues la desecación del tejido habría elevado artificialmente el valor de SST. De cada fruto se tomaron tres muestras de cortes no adyacentes. Una vez obtenidas, las muestras se centrifugaron a 10.000 xg durante 5 minutos. Los tubos se dejaron equilibrar a temperatura ambiente durante 10 minutos después de la centrifugación, cuidando que el sedimento no se resuspendiese.

El índice de refracción se midió en un refractómetro Shibuya tipo High-contrast No. 121. El refractómetro se calibró con una gota de agua destilada a temperatura ambiente y después se depositó en el prisma una gota del sobrenadante de la papilla de mesocarpio. Se leyó el índice de refracción expresado en grados Brix.

III.2.1.5. Determinación del pH en el mesocarpio

La medida del pH se realizó en la misma papilla preparada para la determinación de SST (Apartado III.2.1.4.) utilizando un pHmetro de penetración Crison de 4 mm de diámetro. Una vez tomada la gota para la determinación de SST, se realizó la medida del pH introduciendo el electrodo de penetración,

previamente calibrado, en el tubo eppendorf que contenía el resto de la muestra (0,5-0,7 mL).

III.2.1.6. Determinación de la concentración de glucosa y de fructosa en mesocarpio

III.2.1.6.1. Preparación de extractos perclóricos

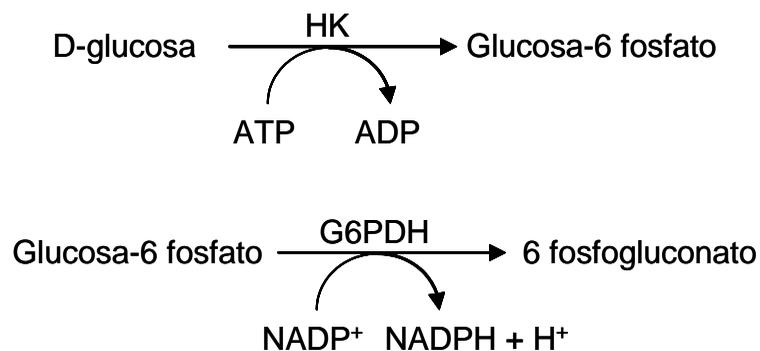
Se tomaron 3 g de polvo de mesocarpio de chirimoya (apartado III.2.1.3.), se añadieron 7 mL de ácido perclórico al 4 % (v/v) y se realizó un homogeneizado utilizando un homogeneizador-dispersador de tejidos Ultraturax (IKA Labortechnik) durante 2 minutos a la máxima velocidad. El homogeneizado resultante se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Antes de realizar las determinaciones, el homogeneizado se centrifugó a 1.600 *xg* durante 30 minutos a 4 °C y el sobrenadante o extracto se transfirió a un nuevo tubo y se añadió azul de bromotimol como indicador. A continuación, se añadió NaOH hasta el viraje del indicador a verde (pH=7), se centrifugó a 1.600 *xg* y se conservó el sobrenadante para la determinación de la concentración de azúcares.

III.2.1.6.2. Determinación de la concentración de glucosa

La glucosa se ha determinado enzimáticamente por el método de la hexokinasa (HK) y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Se ha utilizado la técnica descrita por Bergmeyer *et al.*, (1974) con modificaciones. El método

está basado en el acoplamiento de la fosforilación de la D-glucosa existente en la muestra con la reducción del NADP^+ mediante las reacciones siguientes:



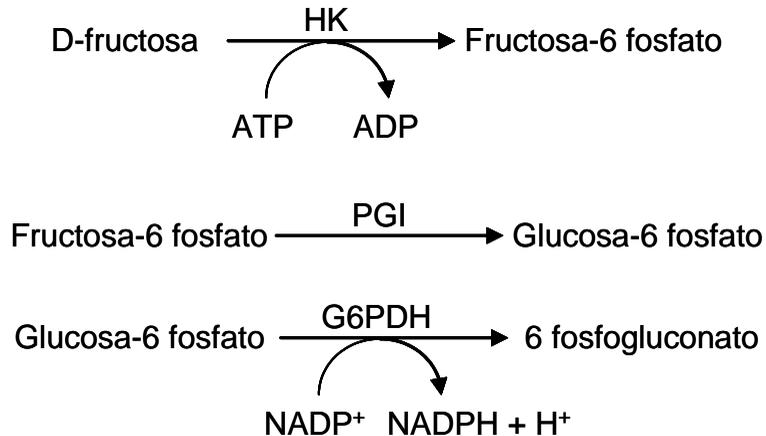
La producción molar de NADPH se cuantificó midiendo la absorbancia a 340 nm. El medio de reacción se componía de tampón Trietanolamina 0,5 M pH 7,5, MgSO_4 2,5 mM, ATP 10 mM, NADP^+ 0,8 mM, 1 U de HK y 1 U de G6PDH. El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 1 mL, a 25 °C.

Una vez adicionada la muestra (25 μL) al medio de reacción sin los enzimas se realizó la primera medida de absorbancia (DO_1), a continuación se añadieron 1 U de HK y 1 U de G6PDH y se esperó a obtener un valor estable de absorbancia para realizar la segunda medida (DO_2). La diferencia entre DO_2 y DO_1 (ΔDO) corresponde al incremento debido a la glucosa preexistente.

III.2.1.6.3. Determinación de la concentración de fructosa

La fructosa se ha determinado enzimáticamente por el método descrito por Bernt (1974) con algunas modificaciones. Este método se basa en la medida de la

DO a 340 nm desarrollada por la producción de NADPH cuando se acoplan las reacciones catalizadas por la hexoquinasa (HK), la fosfoglucosa isomerasa (PGI) y la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) de la forma siguiente:



Este método es similar al descrito para la determinación de la concentración de glucosa, por lo que la glucosa existente en la muestra interfiere en la medida. Por esta razón, hay que oxidar toda la glucosa presente antes de adicionar la fosfoglucosa isomerasa. El procedimiento realizado fue que, una vez medida la glucosa, al mismo medió de reacción se añadió 2,4 U de PGI y se esperó a obtener un valor estable de absorbancia para realizar la medida (DO₃). La diferencia entre DO₃ y DO₂ (Apartado III.2.1.6.2.) (ΔDO) representa el incremento debido a la fructosa preexistente.

III.2.1.6.4. Cálculos

La concentración de monosacáridos se expresó en mg de glucosa o fructosa/g tejido. La conversión de los valores de DO en estas unidades se realizó mediante la siguiente transformación:

$$C \text{ (mg glucosa o fructosa/g de tejido)} = \frac{\Delta DO}{\epsilon \times d} \times F_d \times F_n \times P_m \times \frac{V_i}{\text{g de tejido}}$$

Siendo:

$$\epsilon = 6,22 \text{ mL}/\mu\text{mol} \times \text{cm}$$

$$d = 1 \text{ cm}$$

F_d = Factor de dilución de la muestra en el medio de reacción

F_n = Factor de neutralización

P_m = Peso molecular del monosacárido correspondiente (mg/ μ mol)

V_i = Volumen inicial del extracto (mL)

g de tejido = g de tejido en el extracto

III.2.2. Métodos para el estudio de proteínas de estrés

III.2.2.1. Obtención de extractos de mesocarpio para electroforesis

Se tomaron 2 g de polvo de mesocarpio de chirimoya (apartado III.2.1.3.), se añadieron 2 mL de tampón A (Tris 40 mM, PVPP 5 % p/v) al que se había adicionado extemporáneamente PMSF hasta una concentración final de 0,5 mM, y se homogeneizó con un homogeneizador de tejidos Ultraturax (IKA Labortechnik) durante 2 minutos a la máxima velocidad. El homogeneizado resultante se centrifugó a 15.000 xg durante 5 minutos a temperatura ambiente

para sedimentar el PVPP y los restos de tejido. El sobrenadante o extracto se distribuyó en tubos eppendorf que se conservaron a -80 °C hasta su utilización.

III.2.2.2. Preparación de muestras para electroforesis

Se tomó 1 mL de extracto de mesocarpio y se adicionó el mismo volumen de cloroformo:metanol (1:1) para precipitar las proteínas. Se centrifugó a 15.000 *xg* durante 2 minutos, obteniéndose tres fases: una fase superior metanólica, una fase inferior clorofórmica y una fase intermedia de naturaleza proteica. Descartamos las fases superior e inferior y el precipitado de proteínas se lavó dos veces con acetona, que se dejó evaporar. Una vez seca la muestra, se utilizó de forma diferente según el tipo de electroforesis que se fuera a realizar.

Para SDS-PAGE las muestras se resuspendieron en 200 μ L de tampón de carga para SDS-PAGE que contenía Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2 %, Glicerol 10 %, β -mercaptoetanol 5 %, Azul de bromofenol. Posteriormente las muestras se calentaron a 95 °C durante 10 minutos y se agitaron hasta su completa disolución.

Para electroforesis bidimensional las muestras se resuspendieron en 500 μ L de tampón para isoelectroenfoque que contenía Urea 8 M, DTT 50 mM, CHAPS 4 %, Anfólitos 0,2 %, Azul de bromofenol. Se agitó hasta la resuspensión completa evitándose el calentamiento.

III.2.2.3. Electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se prepararon geles separadores del 10 o 12 % de poliacrilamida (Tabla III.1) entre vidrios con separadores de 0,75 o de 1,5 mm que se cubrían con agua hasta la completa gelificación. Posteriormente se vertió sobre ellos la disolución de poliacrilamida al 4 % (Tabla III.1) que actúa como gel concentrador. En ella se moldearon pocillos para la carga de las muestras que se aplicaron junto a marcadores de peso molecular. En cada pocillo se cargó el volumen de muestra necesario para tener la cantidad de proteínas conveniente en cada caso.

Para la electroforesis se utilizó el sistema Mini-protean® 3 Cell de Bio-Rad. La electroforesis se realizó a 150 voltios en tampón de electroforesis TGS (Tris 25 mM, Glicocola 192 mM, SDS 0,1 % (p/v)) hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó el límite del gel. Inmediatamente después de la electroforesis se procedió a la tinción del gel.

	Gel separador	Gel concentrador
Acrilamida/Bisacrilamida	12 % ó 10 %	4 %
SDS	0,1 %	0,1 %
Tris HCl pH 8,8	0,375 M	-----
Tris HCl pH 6,8	-----	0,125 M
TEMED	0,065 % (v/v)	0,1 % (v/v)
APS	0,065 % (p/v)	0,13 % (p/v)

Tabla III.1. Composición de los geles de acrilamida.

III.2.2.4. Electroforesis bidimensional

La electroforesis bidimensional consta de dos etapas, una primera de isoelectroenfoque (IEF) en la que las proteínas se separan según su punto isoeléctrico y otra segunda de SDS-PAGE para separar las proteínas según su peso molecular.

Para el IEF se utilizaron tiras prefabricadas de 7 cm de longitud con un gradiente de pH 5-8 o de pH 4-7 (Bio-Rad). En cada carril de la cubeta de enfoque se puso el volumen de muestra (preparada según el apartado III.2.2.2) que contenía 150 µg de proteínas y se completó hasta 125 µL de volumen total con tampón para isoelectroenfoque (apartado III.2.2.2.). La muestra se debe extender a lo largo de todo el canal. A continuación, se colocó la tira de IEF con el gel deshidratado hacia abajo, haciendo coincidir el extremo ácido de la tira con el ánodo de la cubeta y con la precaución de que no queden burbujas de aire atrapadas debajo del gel. Cada tira se cubrió con 1 mL de aceite mineral para prevenir la evaporación de la muestra durante la hidratación del gel y posterior electroenfoque. La cubeta tapada se introdujo en el Protean IEF® cell (Bio-Rad) y se realizó el isoelectroenfoque según el siguiente programa: una etapa de rehidratación activa durante 12 horas a 50 V, un primer paso de 15 min a 250 V, a continuación 30 min a 500 V y finalmente a 4.000 V hasta 28.000 V/h. Todas las etapas se realizaron a 20 °C.

Una vez terminado el programa de isoelectroenfoque, las tiras debían ser equilibradas en un tampón adecuado para eliminar los anfolitos y desnaturalizar las proteínas para la segunda dimensión en SDS-PAGE. Para ello, las tiras colocadas con el gel hacia arriba en una cubeta de equilibrio se incubaron durante 20 minutos con 2,5 mL de tampón de equilibrio I (Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, Urea

6 M, SDS 2 %, Glicerol 20 %, DTT 2 %), transcurrido este tiempo se decantó este tampón y se equilibraron durante otros 20 minutos con 2,5 mL de tampón de equilibrio II (Tris-HCl 0,375 M pH 8,8, Urea 6 M, SDS 2 %, Glicerol 20 %, Iodoacetamida 2,5 %). Con este tratamiento las proteínas estaban desnaturalizadas, los puentes disulfuro reducidos y los grupos -SH convenientemente acetilados y, por lo tanto, preparadas para la realización de la segunda dimensión. Antes, las tiras se enjuagaron con tampón TGS (apartado III.2.2.3.).

La segunda dimensión se realizó mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10 % (Tabla III.1) con un grosor de 1,5 mm. La tira de IEF se colocó perpendicular a la dirección de la corriente sobre la parte superior del gel de acrilamida. El contacto entre el gel de poliacrilamida y la tira de IEF se consiguió con una disolución de agarosa al 0,5 % en TGS, a la que se añadió azul de bromofenol para marcar el frente de la electroforesis. En un extremo se cargó un pequeño volumen de la mezcla de marcadores de peso molecular embebido en un trocito de papel Whatman. La electroforesis se realizó a 200V en TGS hasta que el frente de azul de bromofenol alcanzó el límite del gel. Una vez terminada la electroforesis, los geles se tiñeron.

III.2.2.5. Tinción con azul Coomassie

Para la tinción con azul Coomassie se mantuvo el gel sumergido en la solución de tinción (Coomassie Brilliant Blue G-250 0,2 % (p/v), metanol 40 % (v/v) y ácido acético 15 % (v/v)) durante 1 hora con agitación permanente y a temperatura ambiente. A continuación, se destiñó el color del fondo del gel lavando varias veces con agitación con una solución de metanol 40 % (v/v) y

ácido acético 15 % (v/v) en agua destilada. Finalmente, el gel se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente con metanol 40 % (v/v) y glicerol 5 % (v/v) en agua destilada y se secó entre papel de celofán para su conservación.

III.2.2.6. Tinción con plata

La tinción con plata se realizó con el Kit Silver Stain Plus (Bio-Rad) siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez terminada la electroforesis, se fijaron los geles manteniéndolos en la solución fijadora (Metanol 50 % (v/v), Ácido acético 10 % (v/v), Fixative Enhancer concentrate 10 % (v/v), en agua destilada) con suave agitación durante 30 minutos. A continuación, se aclararon 2 veces con agua destilada durante 20 minutos cada una, también con agitación, y se introdujeron en la solución de tinción (Silver Complex Solution 5 % (v/v), Reduction Moderador Solution 5 % (v/v), Image Development Reagent 5 % (v/v), Development Accelerator Solution 50 % (v/v), en agua destilada) durante aproximadamente 30 minutos o hasta que se alcanzó la intensidad de color deseada. Después se paró la tinción con una disolución de ácido acético al 5 % (v/v) durante 15 minutos. Los geles se aclararon con agua destilada, se fotografiaron digitalmente y se secaron entre papel celofán para su conservación.

III.2.2.7. Transferencia de proteínas a membrana e inmunodetección

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE se transfirieron a una membrana de PVDF (Amersham Pharmacia), para la transferencia se utilizó el sistema Mini Trans-Blot Cell® de Bio-Rad. Se montó el cassette de transferencia,

colocando el gel en el polo negativo del portageles y en el polo positivo la membrana de PVDF previamente equilibrada (10 segundos en metanol, 5 minutos en agua destilada, 10 minutos en tampón de transferencia). Se introdujo en la cubeta de transferencia que se llenó con el tampón de transferencia (Tris 25 mM, Glicocola 192 mM, metanol 20 % (v/v)) que había sido conservado a 4 °C. Para que la transferencia de proteínas tenga lugar en frío durante todo el proceso, se introdujo un bloque de hielo en la cubeta y se desarrolló bajo agitación permanente. La transferencia se realizó durante 1 hora a 100 V.

Una vez terminada la transferencia, los sitios de unión libres de la membrana se bloquearon en una solución de leche desnatada en polvo al 5 % en TBS-Tween (Tris HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM, Tween 20 0,1 % (v/v)), durante un tiempo mínimo de 1 hora. Pasado este tiempo, la membrana se enjuagó 2 veces con TBS-Tween y se lavó durante 5 minutos con TBS-Tween. A continuación, se incubó durante 1 hora con una dilución adecuada del correspondiente anticuerpo frente a sHSPs en la misma solución de bloqueo. Después de lavar la membrana 2 veces con TBS-Tween durante 10 minutos cada una, se incubó durante 2 horas con una dilución adecuada de anticuerpo anti IgG en la solución de bloqueo. Por último, se lavó la membrana 3 veces con TBS-Tween durante un periodo de 10 minutos cada una. Todas las etapas de lavado e incubación se realizaron con agitación suave.

Las membranas se revelaron con diaminobencidina. La diaminobencidina es oxidada por la peroxidasa formándose un producto marrón insoluble. Después de los lavados, la membrana se incubó con una disolución de diaminobencidina 1,11 mM en Tris HCl 0,05 M pH 8, Sulfato amónico 12,66 mM, Sulfato de Niquel 12,66 mM, H₂O₂ 0,04 % (v/v) hasta que aparecieron las bandas, la reacción se paró con agua destilada.

III.2.2.8. Preparación de muestras para MALDI-TOF MS

Las proteínas correspondientes a diferentes extractos de chirimoya fueron separadas por electroforesis bidimensional y teñidas con azul Coomassie. Se compararon los perfiles de proteínas obtenidos a partir de frutos tratados con diferentes condiciones y se seleccionaron aquellas que aparecían específicamente en muestras sometidas a estrés. Las manchas correspondientes a esas proteínas se escindieron de los geles con un bisturí y se sometieron a una digestión con tripsina usando el kit Proteoprofile™ Trypsin In-Gel Digestion (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit consiste en un primer paso de desteñido de los fragmentos de gel por incubación con una solución decolorante y un segundo paso de digestión proteolítica en una solución de tripsina que se dejó incubar durante toda la noche (12-18 h) a 37 °C. Al día siguiente, se recogió el sobrenadante que contenía los fragmentos tripticos de la proteína.

Las muestras se purificaron y concentraron con puntas de pipeta Zip-Tip C₁₈ (Millipore). Las puntas de pipeta Zip-Tip tienen una fase estacionaria hidrofóbica que retiene los fragmentos de las proteínas y permite eliminar contaminantes como restos de acrilamida y sales que pueden interferir en la identificación por MALDI-TOF. A continuación, los péptidos retenidos son eluidos con una disolución de ácido trifluoroacético (TFA) 0,1 % y acetonitrilo (ACN) 50 %.

III.2.2.9. Identificación de proteínas con MALDI-TOF MS

Para la identificación de proteínas se usó la técnica de MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight Mass Spectrometry)

que se realizó en los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada en un Bruker mod. Autoflex. En esta técnica se aplica un láser de luz durante un nanosegundo a una mezcla que contiene la molécula a identificar en una matriz que absorbe luz UV. La mayoría de la energía del láser es absorbida por la matriz, lo que previene la fragmentación no deseada de la molécula. Las moléculas ionizadas son aceleradas en un campo eléctrico y entran en una columna en la que son separadas según su peso molecular y según su carga, alcanzando el detector a diferentes tiempos (Time Of Flight) y por tanto cada molécula da una señal eléctrica distinta.

Cada proteína de las muestras de chirimoyo produjo un conjunto característico de péptidos trípticos que fueron separados por MALDI-TOF MS. El perfil de fragmentos trípticos de cada proteína de chirimoyo se introdujo en la base de datos MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) para la identificación de la proteína por comparación con los fragmentos trípticos de otras proteínas incluidas en la base de datos.

III.2.2.10. Marcaje de proteínas con [³⁵S]-metionina

Las proteínas que se sintetizan en mesocarpio de chirimoya durante el almacenamiento a bajas temperaturas se marcaron con [³⁵S]-metionina. Para ello, las chirimoyas se inyectaron en una zona del mesocarpio con 66 µCi de [³⁵S]-metionina y se almacenaron a 4 °C durante 24 horas. Posteriormente se mantuvieron a 20 °C durante cuatro días (Apartado III.2.2.2.). El grupo de frutos control se mantuvo a 20 °C durante todo el tratamiento.

Los extractos proteicos obtenidos de la zona en torno a la inyección se analizaron por electroforesis bidimensional y las proteínas marcadas se detectaron mediante autorradiografía. Para ello, después de la electroforesis las proteínas se tiñieron con azul comassie, los geles se secaron entre dos láminas de papel celofán y se expusieron en un *cassette* junto a una película radiográfica. El tiempo de exposición fue bastante largo (1-2 meses) debido a que la cantidad de radiactividad detectada con un contador Geiger-Müller fue baja.

Las proteínas marcadas con [³⁵S]-metionina, que se sintetizan en mayor concentración después de los tratamientos de estrés, se escindieron del gel, se digirieron con tripsina y se analizaron con MALDI-TOF.

III.2.2.11. Cuantificación de la concentración de proteínas

La cuantificación de la concentración de proteínas se ha realizado utilizando dos métodos distintos.

De forma general se utilizó el método descrito por Bradford (1976). La técnica se basa en que el Coomassie Brilliant Blue G-250 puede existir en dos formas con diferente color, la roja que vira a la azul al formarse el complejo proteína-colorante. Este complejo presenta un máximo de absorción a 595 nm y un coeficiente de absortividad molar elevado, lo que le proporciona gran sensibilidad el método.

Para la medida se preparó una curva patrón de albúmina con un margen de concentraciones entre 0,01 y 0,2 mg/mL y las muestras se diluyeron de forma adecuada. Todos los tubos se llevaron a un volumen final de 100 µL. A cada uno

de los tubos de la curva patrón y de las muestras se le añadió 1 mL de reactivo de Bradford (100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250, 50 mL etanol 95%, 100 mL ácido fosfórico 85% (p/v), agua hasta un volumen final de 1 L), y se midió la densidad óptica a 595 nm.

Mediante este método la concentración de proteínas y la DO medida presentan una relación no lineal. La concentración de proteínas de las muestras se obtuvo por interpolación de los valores de densidad óptica en la curva patrón y teniendo en cuenta el factor de dilución utilizado.

Cuando la muestra contenía sustancias que podían interferir con el reactivo de Bradford como detergentes o agentes reductores la cuantificación de proteínas se realizó utilizando el Kit comercial RC DC Protein Assay de Bio-Rad.

Este ensayo colorimétrico está basado en el método de Lowry pero que ha sido modificado para que sea compatible con la presencia en la muestra de agentes reductores (RC) y de detergentes (DC). Como en el método de Lowry, el desarrollo de color se produce en dos pasos: reacción entre las proteínas y el ión cobre en medio alcalino y posterior reducción del reactivo de Folin por estos complejos produciendo una o más especies reducidas que tienen un máximo de absorción a 750nm.

La medida de la concentración de proteínas se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Se preparó una curva patrón con un margen de concentraciones de albúmina de 0,2 a 1,5 mg/mL y se diluyeron convenientemente las muestras. El volumen final de cada tubo fue de 25 μ L a los que se añadieron 125 μ L de RC reactivo I, se agitó, se añadieron 125 μ L de RC

reactivo II y se centrifugó 15 min a 15.000 xg . Se obtiene así un precipitado de las proteínas presentes en la muestra libre de sustancias que puedan interferir en la reacción posterior y que son desechadas con el sobrenadante. A este precipitado se le adicionaron 127 μL de DC Reactivo A' (5 μL de reactivo S por cada 250 μL de reactivo A), se dejó incubar 5 min o hasta que el precipitado se disolvió totalmente y se añadió 1 mL de reactivo de Folin, después de 15 minutos se midió la densidad óptica a 750 nm.

Mediante este método la concentración de proteínas y la DO medida presentan una relación lineal. La concentración de proteínas de las muestras se obtuvo por interpolación de su densidad óptica en la curva patrón y teniendo en cuenta el factor de dilución utilizado.

III.2.3. Clonación de genes de estrés

III.2.3.1. Extracción de RNA

La extracción de RNA total de mesocarpio de chirimoya se realizó según el método descrito por Zhou *et al.*, (1999) con algunas modificaciones.

Se utilizó 1 g de polvo de mesocarpio de chirimoya preparado según el apartado III.2.1.3., se añadieron 5 mL de tampón de extracción de RNA (Tris-HCl 100 mM pH 9, β -mercaptoetanol 100 mM) y la mezcla se incubó durante 10-15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se añadieron 125 μL de SDS 20 % (p/v), se agitó el tubo por inversión y se centrifugó a 8.000 xg durante 10 minutos a 4 °C. Para precipitar el RNA el sobrenadante se transfirió a otro tubo y se adicionó 1/3 del volumen de LiCl 8M, se agitó y se incubó durante 2 horas a

4 °C. Se centrifugó a 15.000 xg durante 20 minutos a 4 °C y el precipitado de RNA se lavó con 1 mL de etanol al 75 % (v/v), se dejó secar al aire y se resuspendió en 600 μ L de agua DEPC. Una vez resuspendido se añadieron 600 μ L de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:23:1) y se centrifugó a 10.000 xg durante 10 minutos, a 4 °C. La fase superior se transfirió a un tubo limpio y se extrajo varias veces con 1 volumen de la mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (24:23:1) hasta que la interfase desapareció. Finalmente, la fase acuosa se extrajo con 1 volumen de cloroformo y se centrifugó a 10.000 xg durante 10 minutos, a 4 °C. La fase superior se pasó a un tubo limpio, al que se añadió 1 volumen de isopropanol y la mezcla se incubó durante 30 minutos a -20 °C para precipitar el RNA. El RNA se recogió por centrifugación a 16.100 xg durante 15 minutos, a 4 °C y se lavó con etanol al 70 % (v/v). El precipitado final de RNA se secó al aire y se resuspendió con un volumen adecuado de agua DEPC según el tamaño del precipitado.

III.2.3.2. Cuantificación de RNA

La cuantificación de ácidos nucleicos se realizó espectrofotométricamente midiendo la densidad óptica de la muestra a 260 nm y a 280 nm. La concentración de RNA se calculó sabiendo que 1 unidad de densidad óptica a 260 nm corresponde a una concentración de 40 μ g/mL de RNA.

La relación DO_{260}/DO_{280} se utilizó para analizar la calidad de la muestra, un valor por debajo de 1,8 indica contaminación por proteínas o por fenol.

III.2.3.3. Electroforesis de RNA

La electroforesis de RNA se realizó en cubetas para electroforesis Horizon® 11·14 de Life Technologies.

Las muestras para electroforesis se prepararon mezclando la cantidad adecuada de RNA (1-2 µg) en un volumen final de 15 µL, con 5 µL de tampón de carga desnaturante (formamida 50 % (v/v), formaldehído 15 % (v/v), azul de bromofenol 0,04 % (p/v), glicerol 10,4 % (v/v) en tampón borato(ácido bórico 50 mM, borato sódico 5 mM, sulfato sódico 9,86 mM, EDTA 1 mM pH 8, DEPC 0,1 % (v/v)) y 1 µL de bromuro de etidio al 2 % (v/v). Antes de cargar las muestras en el gel se calentaron a 65 °C durante 10 minutos.

La electroforesis de RNA se realizó en geles desnaturantes de agarosa (agarosa al 1 % (p/v) en tampón borato, 8% (v/v) formaldehído) a 60 V en tampón borato.

Las bandas de RNA se visualizaron con luz ultravioleta (254nm-300nm) en un transiluminador (New Brunswick Scientific) y se fotografiaron.

III.2.3.4. Retrotranscripción (RT)

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit First Strand cDNA Síntesis de Amersham siguiendo las instrucciones del fabricante. Se partió de 1-5 µg de RNA en 8 µL de agua-DEPC y se desnaturizó a 65 °C durante 10 minutos. A continuación, se añadieron 5 µL de la disolución “Bulk first-strand cDNA reaction mix” que suministra el kit comercial (transcriptasa inversa, BSA, dATP, dCTP,

dGTP, dTTP), 1 μ L de DTT 200 mM y 1 μ L de oligonucleótido 14 μ M. La mezcla se incubó 1 hora a 37 °C y se inactivó incubando durante 5 minutos a 90 °C.

III.2.3.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador GeneAmp PCR system 9700 de Perkin Elmer.

Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen final de 50 μ L que contenían DNA molde, 50 pmol de cada oligonucleótido, 5 μ l de tampón *Taq* DNA-polimerasa 10X, 0,1 mM de cada dNTP y 5 U de *Taq* DNA Polimerasa.

Las condiciones de PCR fueron específicas para cada amplificación. La temperatura de hibridación se fijó en función de la temperatura media de fusión de los oligonucleótidos y la duración de la etapa de extensión, en función de la longitud del fragmento de DNA a amplificar, aplicándose como norma general 1 minuto/kilobase.

En general, las condiciones de las reacciones de amplificación fueron las siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 5 minutos, seguido de 25-40 ciclos compuestos de una etapa de desnaturalización de 30-60 segundos a 94 °C, una etapa de hibridación de 30-60 segundos a la temperatura adecuada en cada caso y una etapa de extensión a 72 °C durante 30-60 segundos. Se concluyó con una extensión a 72°C durante 7 minutos (Figura III.2).

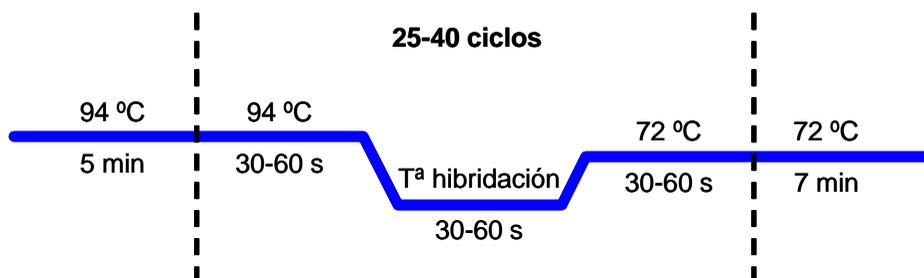


Figura III.2. Esquema de las condiciones generales de desarrollo de PCR.

Todos los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR han sido sintetizados por Sigma-Genosys. En la Tabla III.2 se indica el nombre de cada oligonucleótido, su secuencia y la orientación.

Nombre	Secuencia (5'→ 3')	Orientación
HF2	AAGGCTGACCTGCCTGGGCTG	Sentido
HR1	AGAGATCTCGATGGACTTCACCT	Antisentido
HR2	GGAACAGTAACGGTAAGCACACC	Antisentido
HR3	TCCTCCACCTCCACCTTCAC	Antisentido
HF2R	CAGCCCAGGCAGGTCAGCCTT	Antisentido
HF5	ACTCATTCCTAGTTTCTTCGGTGG	Sentido
Oligo dT	ACGACTCAGTATAGGGC (T) ₁₂ GG	Antisentido
dT-NotI	AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAA (T) ₁₈	Sentido
NotI	AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGG	Sentido
Inic-XbaI	CTAGtctagaATGTCACTCATTCCCTAGTTTC	Sentido
Stop-kpnI	CGGggtaccCCCACGTACGCGCTTCTC	Antisentido

Tabla III.2. Oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR.

III.2.3.6. 5' RACE (Rapid amplification cDNA ends)

Para amplificar el extremo 5' del cDNA de las sHSP se utilizó la técnica de 5' RACE. Se partió de 5 µg de RNA y se retrotranscribió según lo descrito en el apartado III.2.3.4. utilizando un oligonucleótido específico (tabla III.2) del gen que pretendíamos amplificar (HR3). El producto de retrotranscripción se purificó por precipitación con 2 volúmenes de etanol tras la adición de 60 mM de acetato sódico durante 30 minutos a -20 °C. El DNA se recogió por centrifugación a 16.100 *xg* durante 20 minutos a 4 °C y se resuspendió en 10 µL de agua. El cDNA se desnaturalizó incubando a 100 °C durante 2 minutos seguidos de 5 minutos en hielo. A continuación, se añadió una cola de poliA en el extremo 3' del cDNA mediante incubación durante 30 minutos, a 37 °C, con transferasa terminal (Amersham) en presencia de dATP. Finalmente, el enzima se inactivó incubando durante 2 minutos a 65 °C y el producto obtenido se amplificó por PCR. Para la primera reacción de PCR se utilizaron el mismo oligonucleótido específico utilizado para la retrotranscripción (HR3) y el oligonucleótido dT-NotI (Tabla III.2) que se une a la cola de poli A añadida. El producto obtenido se reamplificó utilizando los oligonucleótidos HF2R y NotI (Tabla III.2).

La figura III.3 muestra de forma esquemática las diferentes etapas de esta técnica.

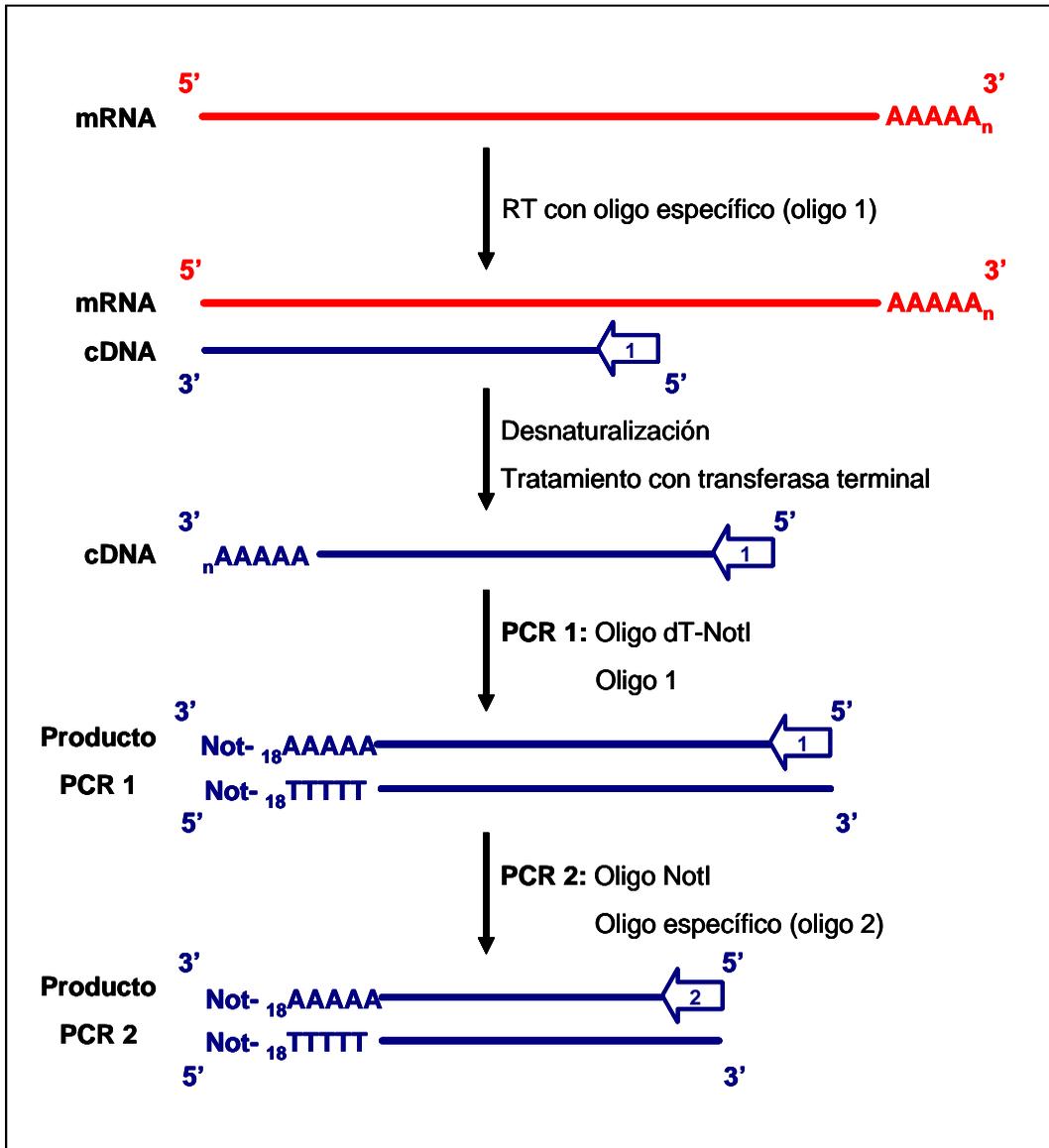


Figura III.3. Etapas de la técnica de 5' RACE.

III.2.3.7. Electroforesis de DNA

La electroforesis de DNA se realizó en cubetas para electroforesis MiniSub ® Cell GT de Bio-Rad.

Las muestras para electroforesis se prepararon mezclando la muestra a analizar con tampón de carga (glicerol 40 % (v/v) y azul de bromofenol en agua destilada) en proporción 4:1.

La electroforesis se realizó en geles de agarosa preparados en tampón TAE (Tris-base 40 mM, Ácido acético glacial 0,11 % (v/v), EDTA-Na₂ 2 mM pH 8). La concentración de agarosa usada varió entre 0,8 % y 2 % dependiendo del tamaño de los fragmentos de DNA a separar. La electroforesis se realizó a un voltaje entre 80-90 V en tampón TAE.

Después de la electroforesis, los geles se tiñeron por inmersión durante 15 minutos en una solución de Bromuro de etidio y tras lavar con agua, el DNA se visualizó mediante exposición del gel a luz ultravioleta (254nm-300nm) en un transiluminador (New Brunswick Scientific) y se fotografiaron.

Los marcadores de peso molecular que se utilizaron fueron λ HindIII de MBL y Step ladder 50 pb de Sigma.

III.2.3.8. Digestión con enzimas de restricción

Las digestiones de DNA con enzimas de restricción se realizaron en las condiciones recomendadas en cada caso por la casa comercial. Los enzimas de restricción que se utilizaron fueron de Amersham, Fermentas y New England

Biolabs. Usualmente las reacciones se realizaron con 0,1-0,5 µg de DNA, 1 µL del tampón 10X suministrado por la casa comercial y 0,5-10 U de enzima de restricción en un volumen final de 10 µL. Las digestiones se realizaron por incubación durante 2 horas a la temperatura óptima del enzima de restricción utilizada.

III.2.3.9. Purificación de fragmentos de DNA de geles de agarosa

Se realizó una electroforesis en geles de agarosa, se identificó el fragmento de DNA de interés y se cortó con un bisturí la zona correspondiente del gel. El DNA se eluyó de la agarosa utilizando el kit NucleoSpin[®] Extract II (Macherey-Nagel) siguiendo las instrucciones del fabricante. El DNA, en presencia de agentes caotrópicos, se une a una membrana de sílica. Las contaminaciones se eliminan de la membrana con un paso de lavado con etanol y finalmente se eluye el DNA con agua o con tampón de elución (Tris-HCl 5mM pH 8,5) proporcionado por el kit.

III.2.3.10. Vectores de clonación

Para la clonación de fragmentos de DNA obtenidos por PCR se utilizó el vector pSTBlue-1 de Novagen (Figura III.4). El vector hecho lineal posee una timina desapareada adicional en 5' que hibrida con la adenina que agrega la *Taq* polimerasa en las reacciones de amplificación, facilitando así la clonación de los productos de PCR. Este vector tiene un gen de resistencia a ampicilina y

kanamicina para la selección de transformantes y también permite la selección azul-blanca por α -complementación.

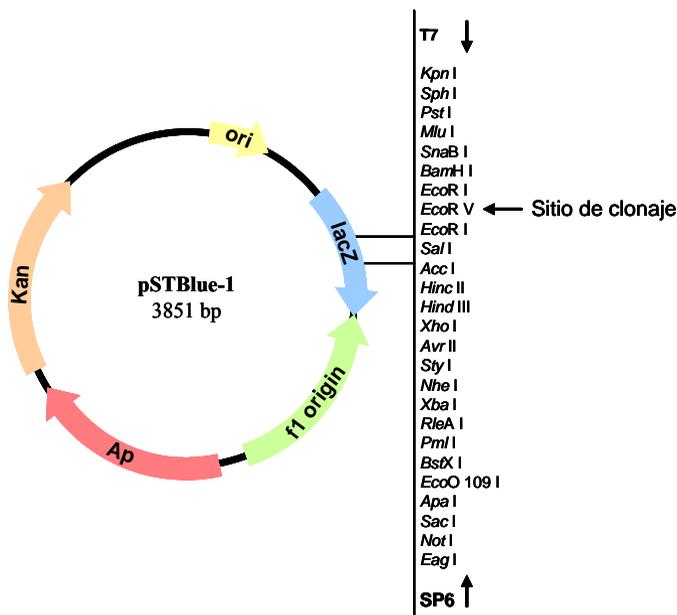


Figura III.4. Mapa de restricción del vector pSTBlue-1.

El vector incluye las secuencias promotoras de los fagos T7, SP6 y M13 que permite secuenciar los fragmentos clonados con oligonucleótidos universales.

III.2.3.11. Ligación

Las reacciones de ligación de fragmentos de DNA obtenidos por digestión con enzimas de restricción o mediante PCR se realizaron utilizando T4 DNA ligasa (Promega) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Normalmente se realizaron en un volumen final de 10 μ L que contenían la cantidad adecuada de vector e inserto en proporción 1:5, 1 μ L de tampón de ligación 10X proporcionado

por la casa comercial y 1 μL de T4 DNA ligasa. La mezcla de reacción se incubó a 10-12 °C durante toda la noche.

III.2.3.12. Cultivos bacterianos

Los medios de cultivo usados para el crecimiento de bacterias se esterilizaron por calor húmedo en un autoclave a 121°C y 1 atmósfera de presión, durante 20 minutos.

Como medio normal de crecimiento de bacterias se utilizó el medio Luria Bertani (LB) (Sambrook *et al.*, 1989), cuya composición es: triptona 1 % (p/v), extracto de levadura 0,5 % (p/v) y NaCl 0,5 % (p/v) en agua destilada. Para la preparación del medio sólido se añadió agar bacteriológico a una concentración final de 1.5 % (p/v).

Los medios de cultivo se suplementaron con diferentes antibióticos para seleccionar las bacterias que contenían el plásmido. Las soluciones de antibióticos se prepararon 1000 veces concentradas, se esterilizaron por filtración utilizando filtros de 0,22 μm de diámetro de poro y se conservaron a -20°C. La concentración final de los antibióticos en el medio de cultivo fue 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la ampicilina (Ap), 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la kanamicina (Km) y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para la tetraciclina (Tc).

En el caso de realizar selección azul/blanca, los medios de cultivo se suplementaron con IPTG (Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido) y X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) en una concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de medio de cultivo. La disolución de partida de IPTG se preparó a una

concentración de 200 mg/mL en agua destilada y la de X-Gal a 20 mg/mL de dimetilformamida, ambas se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

III.2.3.13. Preparación de células competentes

Para los experimentos de clonación y expresión se ha utilizado la cepa XL1-blue de *Escherichia coli*.

La preparación de células competentes se realizó según el método descrito por Nishimura *et al.* (1990). Se puso a crecer una colonia de *Escherichia coli* en 3 mL de LB a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, con agitación durante toda la noche. Se tomaron 0,5 mL de este cultivo, se inocularon en 50 mL de medio A (LB suplementado con glucosa 0,2 % (p/v) y $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 10 mM) y se dejó crecer a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que el cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento ($\text{DO}_{600} = 0,5$). El cultivo se mantuvo en hielo durante 10 minutos y se centrifugó a $1.500 \times g$ durante 10 minutos, a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. El sedimento se resuspendió con suavidad en 250 μL de medio A frío y a continuación se añadieron 1,25 mL de medio B (LB suplementado con glicerol 36 % (v/v), polietilenglicol 7.500 12 % (p/v) y $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 12 mM). Las células competentes se dividieron en fracciones de 100 μL y se conservaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso.

III.2.3.14. Transformación

La transformación de las células competentes se realizó según el método descrito por Nishimura *et al.* (1990). El producto de ligación se añadió a 100 μL

de células competentes (apartado III.2.3.13.) y se mantuvieron en hielo durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, las células se sometieron a un choque térmico de 2 minutos a 42 °C y se incubaron durante 10 minutos en hielo. A continuación se añadieron 900 µL de LB y se dejó que las células crecieran durante 1 hora a 37 °C.

Las bacterias que contenían el plásmido se seleccionaron por su crecimiento en placas de LB-Agar suplementado con el antibiótico adecuado según la resistencia conferida por el plásmido utilizado en cada caso. Para ello, las bacterias se sembraron en estas placas y se incubaron durante toda la noche a 37 °C.

III.2.3.15. Extracción de DNA plasmídico

Para el aislamiento del DNA plasmídico se utilizaron distintos métodos dependiendo del grado de pureza y de la cantidad de DNA requeridos.

III.2.3.15.1. Método de la lisis alcalina

Este método permitió la obtención de DNA plasmídico a pequeña escala que fue utilizado para el análisis de clones después de la transformación. Se siguió el protocolo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Se partió de 1,5 mL de un cultivo líquido de bacterias en LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Las bacterias se recogieron por centrifugación a 16.100 xg durante 3 minutos y se resuspendieron con 100 µL de solución P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 1 mM). A continuación, se añadieron 200 µL de solución de

lisis (NaOH 200 mM, SDS 1 % (p/v)), se agitó el tubo por inversión y la muestra se neutralizó añadiendo 200 μ L de acetato potásico 3M pH 5,5 y se dejó incubar en hielo durante 15 minutos. Tras la incubación se centrifugó durante 10 minutos a 16.100 xg para sedimentar todos los componentes precipitados. El sobrenadante se pasó a un tubo limpio y se añadieron 500 μ L de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) pH = 8, tras una agitación fuerte, se centrifugó durante 3 minutos a 10.000 xg . Se recogió la fase acuosa y se añadieron 500 μ L de una mezcla de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) para eliminar los restos de fenol que pudiesen quedar, se agitó fuertemente y se centrifugó durante 3 minutos a 16.100 xg . Finalmente, la fase acuosa se pasó a un tubo limpio, se añadió 1 mL de etanol y la mezcla se incubó durante 30 minutos a -20 °C para precipitar el DNA. El DNA se recogió por centrifugación a 16.100 xg durante 15 minutos a 4 °C y se lavó con etanol al 75 % (v/v). El precipitado de DNA se secó al aire y se resuspendió en 25 μ L de agua o TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM).

III.2.3.15.2. Método GFXTM Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Biosciences)

Este sistema se utilizó para la preparación rápida de DNA plasmídico libre de RNA para su uso en reacciones de digestión con enzimas de restricción o para su secuenciación. Para la realización de este método se partió de 3 mL de cultivo y se siguieron las instrucciones del fabricante. El fundamento de este kit es similar al de la lisis alcalina, después de la neutralización en vez de utilizar disolventes orgánicos, el lisado se aplica a una columna a la que se une el DNA específicamente. Posteriormente el DNA se eluye de la columna con agua o con TE.

III.2.3.16. Secuenciación

La secuenciación de DNA se realizó en el Servicio de Secuenciación del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra del CSIC de Granada con un secuenciador automático modelo 373 STRECHT (Applied Biosystems). La secuenciación se realizó según el método de Sanger modificado, para el que cada desoxinucleótido está marcado con un cromóforo distinto. Las reacciones para la secuenciación se realizaron en un volumen final de 12 μ L en los que se añadió la cantidad adecuada de DNA y 6,4 pmol de oligonucleótido.

Nombre	Secuencia
M13R	5' -GGAAACAGCTATGACCATG-3'
T7	5' -CTAATACGACTCACTATAGGG-3'

Tabla III.3. Oligonucleótidos empleados en las reacciones de secuenciación.

III.2.4. **Expresión heteróloga en bacterias**

Para la expresión heteróloga de las proteínas de estrés en bacterias, se clonó el cDNA con la secuencia codificante de la proteína en el vector pQE-31 (Figura III.5) que permite obtener la proteína fusionada a 6 histidinas en el extremo amino.

Bacterias de *Escherichia coli* de la cepa XL1-blue transformadas con la construcción (apartado III.2.3.14.) crecieron a 37 °C en medio LB suplementado con ampicilina hasta que el cultivo alcanzó la fase exponencial de crecimiento

($DO_{600} = 0,5-0,7$), en este momento se indujo la expresión de la proteína por adición de IPTG a una concentración final de 1mM.

Para comprobar que la expresión de la proteína había sido inducida se recogieron muestras a distintos tiempos después de la adición de IPTG, se lisaron las células con tampón de carga de SDS-PAGE (apartado III.2.2.2.) y se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida (apartado III.2.2.3).

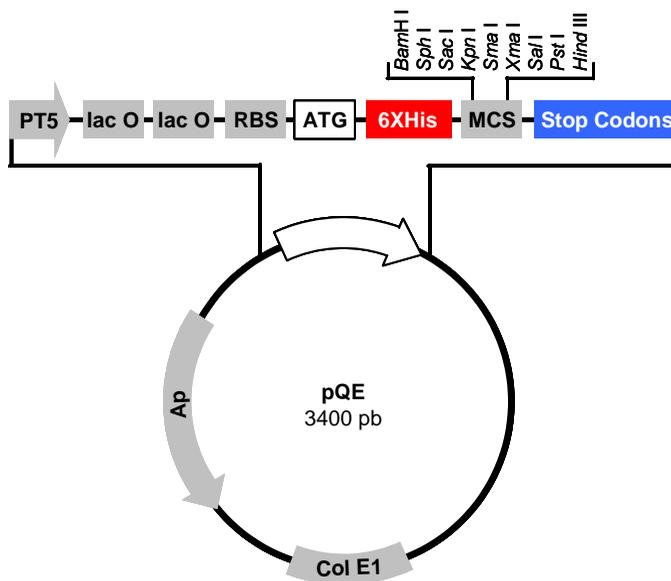


Figura III.5. Mapa de restricción del vector pQE.

III.2.5. Tratamientos de estrés en bacterias

III.2.5.1. Estrés térmico

III.2.5.1.1. Análisis de la estabilidad termal de las proteínas de *Escherichia coli*

Para analizar la estabilidad termal de las proteínas de *Escherichia coli* se siguió el método descrito por Yu *et al.* (2005) con algunas modificaciones. Bacterias transformadas con la construcción (pQE 31-HSP) y bacterias controles (transformadas solo con el plásmido pQE-31) crecieron en 250 mL de LB suplementado con ampicilina y se indujo la expresión de la proteína según lo descrito en el apartado III.2.4. Después de toda la noche a 37 °C, las bacterias se recogieron por centrifugación a 7.500 *xg* durante 15 minutos a 4 °C, se resuspendieron en 5 mL de TE (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1mM pH 7,5) y se congelaron durante toda la noche a -20 °C.

Al día siguiente se descongelaron y se lisaron por sonicación con pulsos cortos durante 5 minutos. Los lisados se centrifugaron a 15.000 *xg* durante 20 minutos a 4 °C y se midió la concentración de proteínas en los sobrenadantes.

Las proteínas en los sobrenadante se diluyeron con TE hasta una concentración de 3 mg/mL y alícuotas de 500 µL se incubaron durante 15 minutos a temperaturas variables desde 30 °C hasta 100 °C en un termobloque. Las muestras se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 15.000 *xg* durante 10 minutos para sedimentar los agregados de proteínas, los sobrenadantes se analizaron mediante SDS-PAGE.

III.2.5.1.2. Estudios de viabilidad

Para los estudios de viabilidad de *Escherichia coli* a altas y a bajas temperaturas se siguió el protocolo descrito por Soto *et al.* (1999) con algunas modificaciones.

Tres horas después de la inducción de la expresión de la proteína en bacterias transformadas con la construcción (pQE 31-HSP) y en bacterias controles (pQE 31) los cultivos se diluyeron con medio LB/Ap hasta una DO_{600} de 0,6 y se incubaron a 50 °C. Después de 0, 30 y 60 min se tomaron alícuotas de los cultivos, se hicieron diluciones y se sembraron en placas de LB-agar/Ap. La viabilidad celular se determinó contando el número de unidades formadoras de colonias (UFC) después de incubar las placas a 37 °C durante toda la noche. El porcentaje de viabilidad se calculó tomando como referencia el número de UFC en las placas correspondientes al cultivo a tiempo 0.

Para los tratamientos en frío, tres horas después de la inducción los cultivos se diluyeron con medio LB/Ap hasta una DO_{600} de 0,6, se hicieron diluciones y se sembraron en placas de LB-agar/Ap. Las placas se incubaron entre -2 y 0 °C durante 3, 5, 7 y 10 días, después se incubaron a 37 °C durante toda la noche para permitir el crecimiento de las bacterias y se contó el número de UFC. El porcentaje de viabilidad se calculó tomando como referencia el número de UFC en las placas correspondientes al cultivo a tiempo 0.

III.2.5.2. Estrés oxidativo

Se indujo la expresión de la proteína (apartado III.2.4.) en bacterias transformadas con la construcción (pQE 31-HSP) y en bacterias controles (pQE 31), tres horas después de la inducción, los cultivos se diluyeron hasta una DO_{600} de 0,6 con medio LB/Ap suplementado con H_2O_2 en una concentración final de 1mM y se dejaron crecer a temperatura ambiente con agitación. Después de 30, 60, 120 min y O/N se cogieron alícuotas de los cultivos, se hicieron diluciones y se sembraron en placas de LB-agar/Ap. La viabilidad celular se determinó contando el número de UFC después de incubar las placas a 37 °C durante toda la noche. El porcentaje de viabilidad se calculó tomando como referencia el número de UFC de un cultivo igual sin H_2O_2 .

III.2.5.3. Estrés salino

Se indujo la expresión de la proteína (apartado III.2.4.) en bacterias transformadas con la construcción (pQE 31-HSP) y en bacterias controles (pQE 31), tres horas después de la inducción, los cultivos se diluyeron hasta una DO_{600} de 0,6 con LB/Ap suplementado con NaCl en una concentración final del 5 % (p/v) y se dejaron crecer a temperatura ambiente con agitación. Después de 60, 120 min y O/N se cogieron alícuotas de los cultivos, se hicieron diluciones y se sembraron en placas de LB-agar/Ap. La viabilidad celular se determinó contando el número de UFC después de incubar las placas a 37 °C durante toda la noche. El porcentaje de viabilidad se calculó tomando como referencia el número de UFC de un cultivo igual con NaCl al 0,5 %.

III.2.6. Transformación de plantas

III.2.6.1. Vectores de transformación en plantas

Para los experimentos de transformación en plantas se utilizó el vector pGUSINT (Vancanneyt *et al.*, 1990) que contiene el promotor 35S de citomegalovirus y un gen de resistencia a kanamicina.



Figura III.6. Mapa de restricción del vector pGUSINT.

La construcción se realizó sustituyendo el gen de la β -glucuronidasa (GUS) del vector por el gen de la proteína de estrés.

III.2.6.2. Transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Para los experimentos de transformación en plantas se ha utilizado la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404.

Para la transformación de *Agrobacterium tumefaciens* se utilizó el método de congelación/descongelación. En 200 mL de LB se inocularon 4 mL de un cultivo de *Agrobacterium* crecido durante toda la noche, se incubó entre 28 y 30 °C durante 5-6 horas y se centrifugó a 2.500 xg durante 5 minutos. El sedimento se resuspendió en 100 mL de Tris-HCl 10 mM pH 8 y se volvió a centrifugar 5

minutos a 2.500 *xg*, el sedimento se resuspendió en 2 mL de LB. Para la transformación se utilizaron 100 μL de células y se añadieron 50 μL de DNA (5 μL de plásmido en 50 μL de agua), la mezcla se congeló durante 5 minutos en nieve carbónica y a continuación se descongeló en un baño a 37 °C durante 25 minutos. A continuación se añadió 1 mL de LB y se incubó a 28 °C durante 1 hora con agitación.

Las bacterias que contenían el plásmido se seleccionaron sembrándolas en placas de LB agar con kanamicina en una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las placas se incubaron entre 28 y 30 °C durante 2-3 días.

III.2.6.3. Esterilización y germinación de semillas

Las semillas se esterilizaron sumergiéndolas durante 15 minutos en lejía al 20 % (v/v), posteriormente se lavaron cinco veces con agua destilada estéril. Para la germinación, las semillas se esparcieron sobre papel de filtro estéril y humedecido y se pusieron en una placa petri de vidrio. Las semillas germinaron en oscuridad a 25 °C durante dos semanas. Posteriormente las semillas germinadas se pasaron a medio Gamborg's B-5 (Sigma) pH 5,8 con 0,6 % de agar y se dejaron crecer a 25 °C con 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

III.2.6.4. Transformación de plantas de tabaco y de *Arabidopsis thaliana*.

La transformación de plantas de tabaco y *arabidopsis* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Horsch *et al.*, (1985) con algunas modificaciones.

El cultivo de *Agrobacterium* se realizó el día antes de la transformación inoculando una colonia de la bacteria en medio LB líquido con kanamicina 50 µg/mL y estreptomycinina 100 µg/mL y se incubó en agitación a 27°C durante toda la noche. Antes de la transformación, el cultivo se centrifugó durante 10 minutos a 1.500 $\times g$ y se resuspendió en medio Murishage and skoog (MS) líquido sin antibióticos.

Después de un mes y medio de crecimiento de las plantas se cortaron fragmentos de hojas de aproximadamente 1 cm² y se sumergieron durante 15 minutos en el cultivo de *Agrobacterium tumefaciens*. Después de la incubación, los discos de hojas se lavaron con agua estéril y se secaron con papel de filtro estéril para eliminar el exceso de *Agrobacterium*. Posteriormente los discos de hojas se incuban en medio de regeneración (medio MS, vitaminas B5, sacarosa 30 g/L, benziladenina (BA) 1 mg/L, ácido naftalenacético (NAA) 0,1 mg/L, agar 0,8 % (p/v) pH 5,7) sin antibióticos durante 48 horas con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Después de 48 horas, los explantos se lavaron con una disolución de cefotaxima 250 µg/mL para eliminar *Agrobacterium*, se secaron con papel de filtro estéril y se transfirieron a medio de selección (medio de regeneración con 250 µg/mL de cefotaxima y con kanamicina para seleccionar los explantos transformados). Se utilizaron distintas concentraciones de kanamicina (0, 50, 100 y 150 µg/mL) para seleccionar la concentración de kanamicina que permite el crecimiento de los explantos transformados pero no el de los explantos controles sin transformar. Cada dos semanas los explantos se pasaron a medio fresco.

Cuando los brotes alcancen un tamaño de 10-20 mm se pasarán a placas con medio de enraizamiento (medio MS, vitaminas B5, sacarosa 30 g/L, agar 0,8 % (p/v) pH 5,7).

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1 Efecto de los tratamientos sobre la maduración de los frutos de chirimoyo.

IV.1.1. Efecto sobre el aspecto externo e interno de los frutos.

Frutos de chirimoyo recogidos en su estado óptimo de maduración fisiológica fueron trasladados al laboratorio y tratados el mismo día de su recolección. Se realizó un tratamiento consistente en el almacenamiento durante 18 horas en frascos de cristalización por los que se hacía pasar un flujo constante de una mezcla de CO₂ y aire en proporciones constantes de CO₂ al 30%, 50%, 75% y 100%, según los casos. Transcurrido este tiempo se almacenaron durante 3 días a 8 °C (una temperatura que produce daños por frío pero no muy severos), después se mantuvieron durante 5 días a 20 °C para inducir la senescencia (Ver figura III.1).

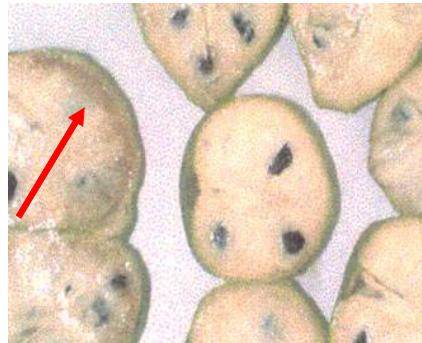
Este tratamiento con proporciones variables de CO₂ no produjo cambios notables en el patrón de maduración, aunque sí dio lugar a un retraso moderado en el tiempo que tardaban los frutos en alcanzar la senescencia. Se observó que el tratamiento producía una buena conservación del aspecto externo de los frutos, disminuyendo de manera notable el pardeamiento del epicarpio (figura IV.1).

Aunque no se observaron cambios aparentes en el aspecto externo de los frutos, cuando las chirimoyas se abrieron para la obtención de muestras de mesocarpio, se hicieron patentes los daños por frío en un alto porcentaje de frutos, así como lesiones producidas por la alta concentración de CO₂. La figura IV.1 muestra una imagen del aspecto interno de estos frutos. Puede observarse en los frutos controles la aparición de bandas pardas próximas al epicarpio, como

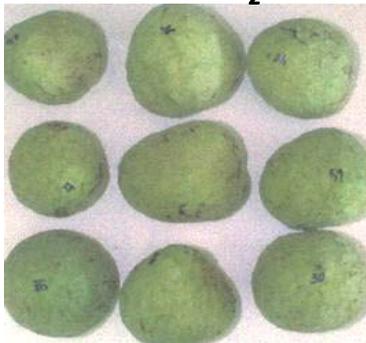
Resultados

consecuencia de necrosis celular y deposición de polifenoles. Resultados semejantes se observaron en frutos tratados con los porcentajes más altos de CO₂, especialmente con la proporción del 75 %. Sin embargo, los frutos tratados con una proporción de CO₂ del 30 % presentaron un perfil adecuado de maduración y no se observaron alteraciones necróticas en su mesocarpio. La mejora respecto a los frutos controles fue muy marcada.

Control 8 °C



30 % CO₂



50 % CO₂





Figura IV.1. Frutos de chirimoyo tratados durante 18 horas con la proporción indicada de CO₂, almacenados posteriormente a 8 °C durante tres días y mantenidos a 20 °C durante otros 5 días para inducir la senescencia. Las flechas señalan lesiones características de daños por frío y por efecto del CO₂.

Parece evidente que el tratamiento con altos porcentajes de CO₂ produce graves perjuicios en la maduración post-cosecha de las chirimoyas, por lo que no se creyó conveniente insistir en estas elevadas concentraciones de CO₂. Los resultados obtenidos con frutos almacenados con el 30% de CO₂ nos llevaron a ensayar porcentajes de CO₂ hasta esa concentración.

Los frutos se almacenaron durante 4 días en atmósferas con porcentajes de CO₂ al 10%, 15%, 20%, y 25% simultáneamente con el almacenamiento a 8 °C, la concentración de O₂ fue del 18 % en todos los casos. Transcurrido este tiempo los frutos se mantuvieron durante 6 días a una temperatura de 20 °C para que se produjera la maduración (Ver figura 3.1).

Este tratamiento también produjo una buena conservación del aspecto externo de los frutos, en la figura IV.2 se puede observar el pardeamiento del epicarpio en frutos controles que no aparece en frutos tratados con CO₂. Al abrir

Resultados

los frutos también se pudo observar una disminución de las lesiones por frío en frutos tratados con CO_2 con respecto a los frutos que solo fueron almacenados a 8°C .

Control 8°C



10 % CO_2



15 % CO_2



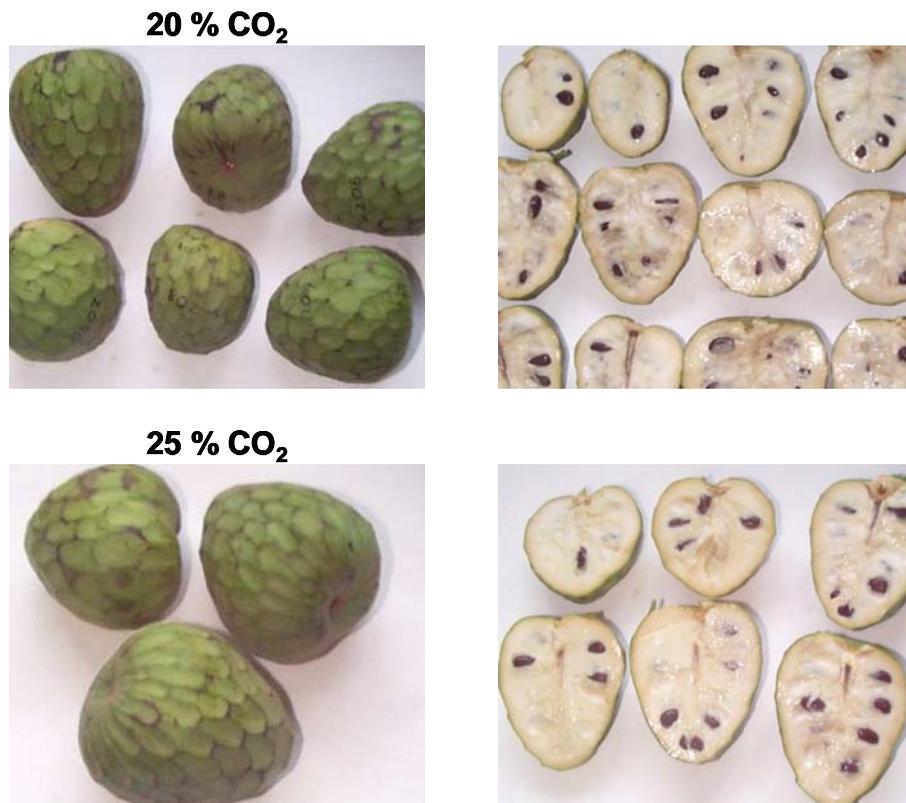


Figura IV.2. Frutos de chirimoyo tratados durante 4 días a 8 °C con la proporción indicada de CO₂ y mantenidos a 20 °C durante otros 6 días para inducir la senescencia. Las flechas señalan lesiones características de daños por frío.

El tratamiento con estas bajas concentraciones de CO₂ produce una mejora de los daños por frío ocasionados por el almacenamiento a 8 °C, además los frutos tratados con CO₂ maduraron de forma correcta sin alterarse ninguna de sus propiedades organolépticas. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos tratados con CO₂.

IV.1.2. Efecto sobre la concentración de sólidos solubles totales en mesocarpio.

Durante la maduración de los frutos se produce una intensa síntesis de sustancias solubles, fundamentalmente azúcares y ácidos orgánicos, procedentes de la degradación de sustancias de reserva. El incremento en la concentración de azúcares y de ácidos orgánicos determina una subida gradual en el índice de refracción, que llega a alcanzar valores que oscilan entre 20 y 24 °Brix, dependiendo de los frutos, variedades botánicas o cultivares y épocas de recolección.

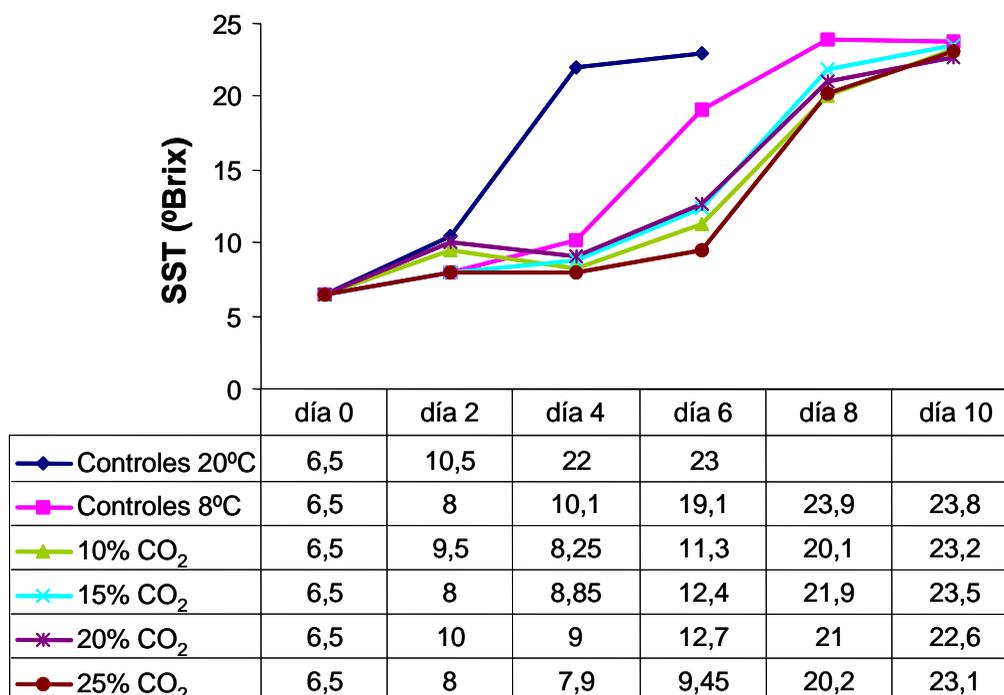


Figura IV.3. Evolución del contenido de SST en mesocarpio de chirimoyas almacenadas en distintas condiciones. Los resultados se expresan en °Brix.

La figura IV.3 muestra la evolución del contenido en sólidos solubles totales (SST) al aplicar los distintos tratamientos. Como puede observarse, cuando

los frutos maduran a 20 °C, el contenido en SST se incrementa rápidamente alcanzando un valor máximo entre los días 4 y 6. Cuando la maduración se produce a 8 °C el aumento de SST es más lento, y no se alcanza un valor máximo hasta el día 8. Este retraso es más acentuado en los frutos tratados con CO₂ donde los SST no se incrementan de forma importante hasta el día 8 y se alcanza el valor máximo el día 10.

En todos los casos, cuando los frutos alcanzan la senescencia los valores de SST son normales, alcanzando los mismos valores que en frutos almacenados a 20 °C.

IV.1.3. Efecto sobre el pH de mesocarpio.

Cuando las chirimoyas son recolectadas el pH del mesocarpio tiene un valor en torno a 6, a lo largo de la maduración se produce la hidrólisis del almidón y parte de la glucosa se transforma en ácidos orgánicos, esto provoca la disminución del pH, que alcanza valores en torno a 4 cuando los frutos llegan al momento óptimo para su consumo.

La figura IV.4 muestra la evolución del pH al aplicar los distintos tratamientos, cuando la maduración ocurre a 20 °C se produce un descenso gradual del pH alcanzándose un valor en torno a 4 el cuarto día tras la recogida coincidiendo con la elevación de la cantidad de SST. Cuando los frutos maduraron a 8 °C el descenso de pH fue más lento y el valor mínimo se alcanzó entre los días 8 y 10. Cuando los frutos se trataron con CO₂ el aumento de acidez se retrasó aún más, alcanzando el valor mínimo el día 10.

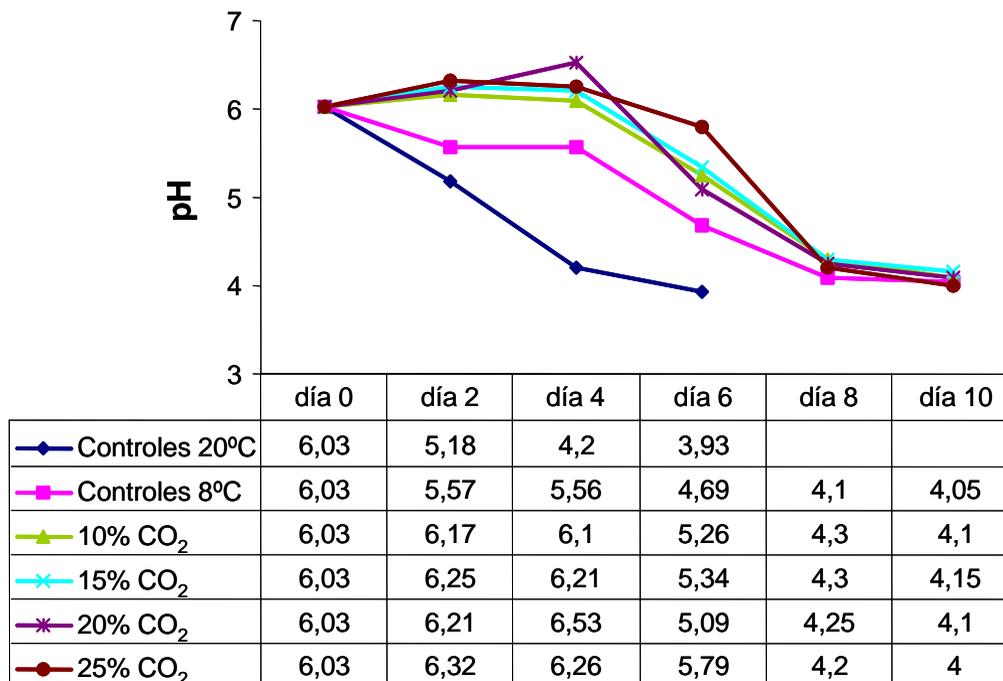


Figura IV.4. Evolución del pH de mesocarpio de chirimoyas almacenadas en distintas condiciones.

En todos los casos, cuando los frutos alcanzan la senescencia los valores de pH son normales, alcanzando los mismos valores que en frutos almacenados a 20 °C.

IV.1.4. Efecto sobre la concentración de azúcares en mesocarpio.

El contenido en azúcares varía mucho de unos frutos a otros e incluso de unas variedades a otras. En términos generales sacarosa, glucosa y fructosa son los principales azúcares encontrados en todos los frutos aunque pueden aparecer otros en cantidades muy inferiores a estos. La glucosa y la fructosa son los

monosacáridos mayoritarios encontrados en la chirimoya, detectándose pequeñas diferencias de concentración entre ambos.

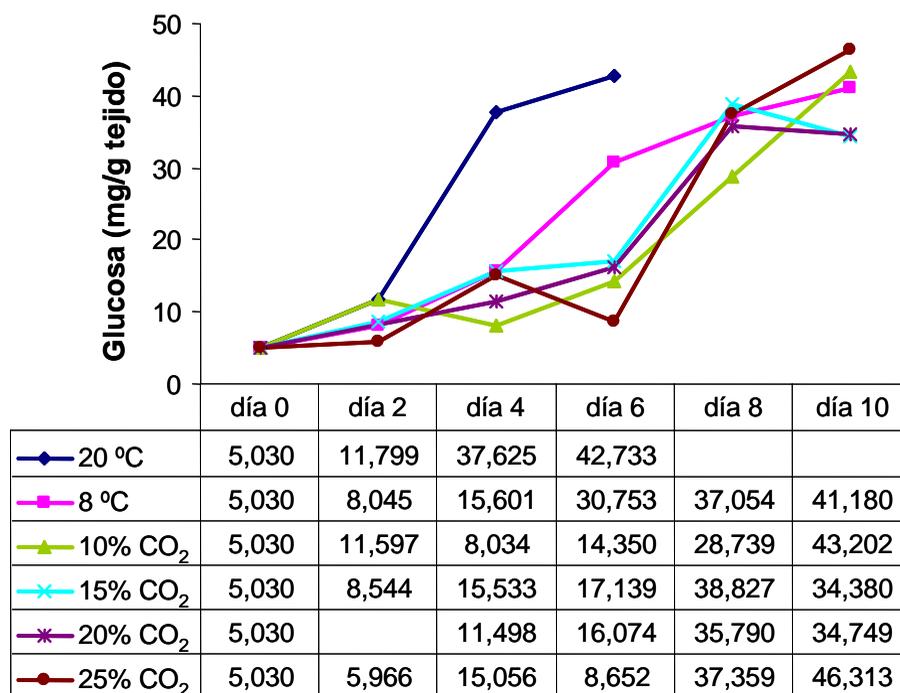


Figura IV.5. Evolución del contenido en glucosa en mesocarpio de chirimoyas almacenadas en distintas condiciones. Los resultados están expresados en mg de glucosa/ g de tejido.

Las figuras IV.5 y IV.6 muestran los cambios en las concentraciones de glucosa y fructosa en el mesocarpio de los frutos al aplicar los distintos tratamientos. En todos los casos la concentración de ambos azúcares se incrementa progresivamente durante la maduración. En frutos que maduraron a 20 °C el mayor incremento se produce el día 4 tras la recogida, alcanzándose el valor máximo el sexto día. En frutos almacenados a 8 °C el incremento de la concentración de azúcares se retrasó hasta el día 6 alcanzando el valor máximo el

Resultados

día 10. En frutos tratados con CO₂ el retraso fue mayor, observándose el mayor incremento el día 8.

En todos los casos, los valores de azúcares obtenidos al final del tratamiento fueron similares a los obtenidos en frutos conservados a 20 °C.

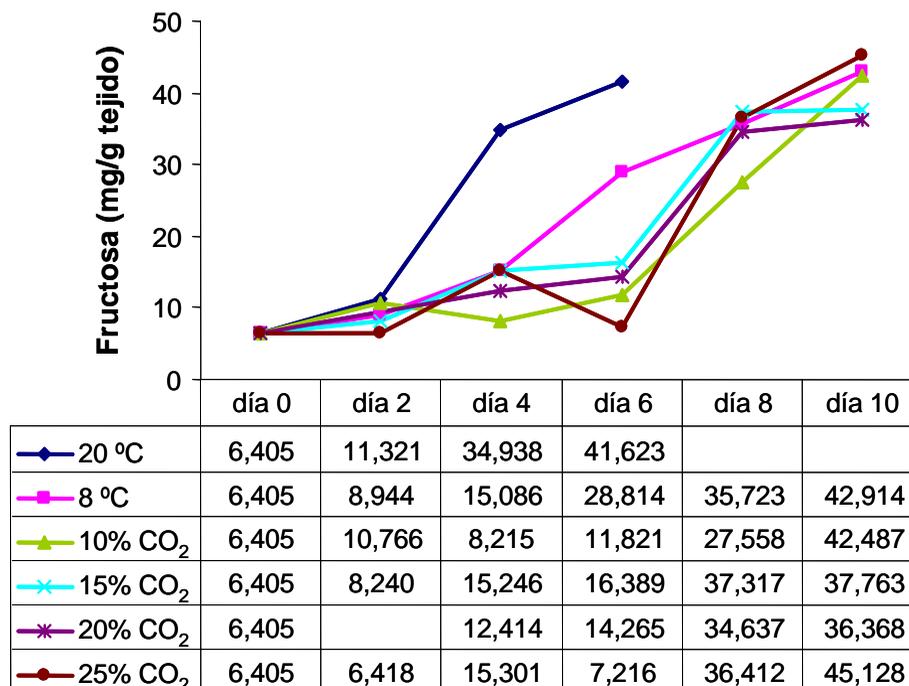


Figura IV.6. Evolución del contenido en fructosa en mesocarpio de chirimoyas almacenadas en distintas condiciones. Los resultados están expresados en mg de fructosa/ g de tejido.

IV.2. Inducción de proteínas en mesocarpio de chirimoya por tratamientos con CO₂ y frío.

Para estudiar el efecto que tiene el tratamiento con CO₂ en la expresión de proteínas en mesocarpio de chirimoya, se analizaron muestras de frutos controles

y de frutos tratados en atmósferas con proporciones variables de CO₂ mediante electroforesis bidimensional, tal como se describe en el apartado III.2.2.4. Para la primera dimensión se utilizaron tiras para isoelectroenfoque de 7 cm con diferentes rangos de pH, obteniéndose los mejores resultados cuando se usaron rangos de pH entre 4 y 7 o entre 5 y 8.

En la figura IV.7 se muestran fotografías de geles en los que se han separado por electroforesis bidimensional extractos proteicos de mesocarpio de chirimoya. Se comparan los resultados de un fruto control que se conservó a 20 °C durante 2 días y de un fruto tratado durante 18 horas con un 30% de CO₂ y después conservado a 8 °C durante 2 días. Se puede observar que el patrón de proteínas de ambas muestras es muy similar pero se aprecian algunas diferencias en la expresión de proteínas de bajo peso molecular. El resultado más aparente es la presencia de dos proteínas que se expresan con gran intensidad en frutos tratados con CO₂ pero que no aparecen en los frutos controles.

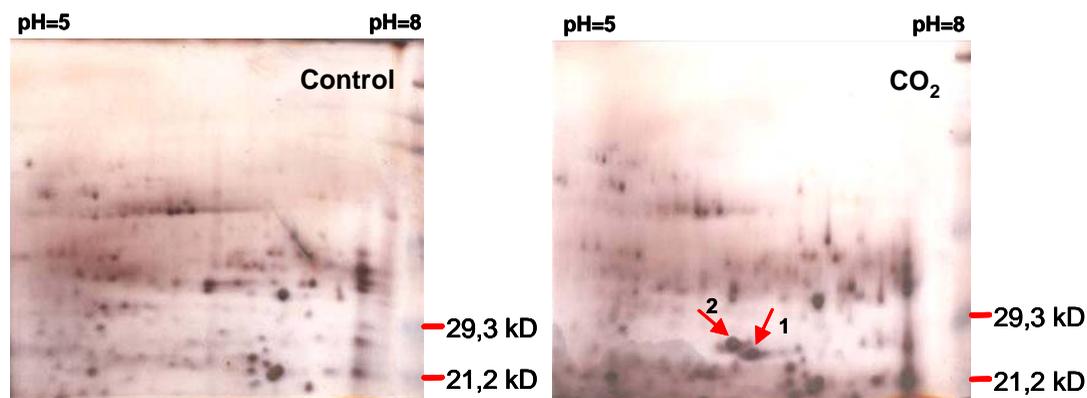


Figura IV.7. Tinción de plata de proteínas separadas por electroforesis bidimensional. Las muestras de proteínas se obtuvieron de un fruto control que se conservó a 20 °C durante 2 días tras su recolección y de un fruto tratado durante 18 horas en una atmósfera con un contenido de CO₂ del 30% y almacenado a 8 °C durante 2 días.

Resultados

Se estudió, además, cómo varía la expresión de estas proteínas inducidas por el tratamiento con CO₂ al ir progresando la maduración. Se hizo electroforesis bidimensional de muestras de mesocarpio obtenidas en días sucesivos de maduración tras ser sometidas a una atmósfera con un 30% de CO₂. En la figura IV.8 se muestra sólo la zona del gel donde aparecen las proteínas de interés. Se puede observar que, al ir progresando la maduración, va disminuyendo la expresión de estas proteínas y en el día 5 después de la recogida la señal es casi imperceptible.

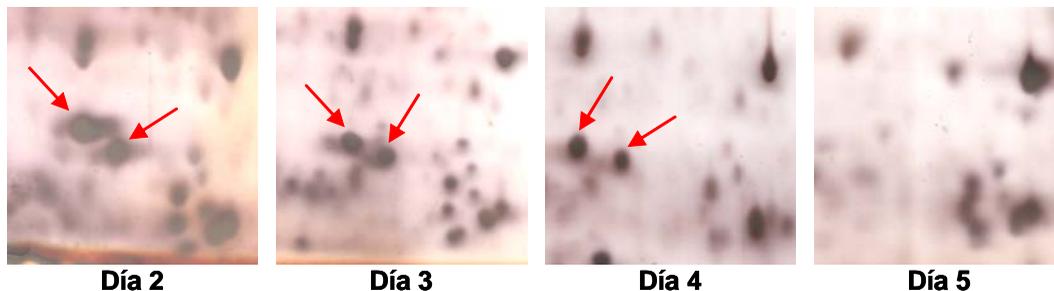


Figura IV.8. Detalle de geles bidimensionales en los que se han separado proteínas extraídas de chirimoyas en sucesivos días de maduración tras ser tratadas con CO₂ al 30 %. Las flechas indican proteínas fuertemente inducidas por el tratamiento.

También estudiamos el efecto que tiene la concentración de CO₂ en la inducción de estas proteínas, en la figura IV.9 se muestra la misma zona de los geles de muestras de mesocarpio de chirimoyas que habían sido tratadas con 50% y 100% de CO₂.

Puede observarse que a concentraciones elevadas de CO₂ no se produce la inducción de estas dos proteínas y que, además, dejan de observarse o se observan

con menor intensidad todas las demás proteínas, aunque la cantidad de muestra cargada en los geles fue idéntica en todos los casos.

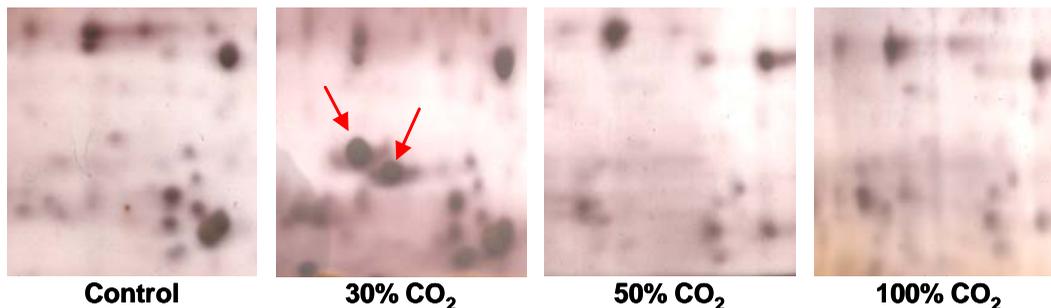


Figura IV.9. Detalle de geles bidimensionales en los que se han separado proteínas extraídas de chirimoyas control y sometidas a tratamientos con CO₂ en las proporciones indicadas, tras 2 días de almacenamiento a 8 °C. Las flechas indican proteínas fuertemente inducidas por el tratamiento con CO₂ al 30 %.

Para comprobar si las proteínas que se han inducido por el tratamiento con CO₂ son proteínas de choque térmico procedimos a su identificación mediante la técnica de MALDI-TOF MS. Para ello las proteínas correspondientes a extractos de mesocarpio de chirimoya que habían sido tratadas con un 30% de CO₂ y conservadas durante dos días a 8 °C se separaron mediante electroforesis bidimensional y se tiñeron con azul Coomassie. Se seleccionaron aquellas proteínas que aparecían específicamente en muestras sometidas a estrés, se escindieron con un bisturí de los geles de poliacrilamida y se sometieron a una digestión con tripsina (Apartado III.2.2.8.).

Como consecuencia de la digestión con tripsina cada proteína produce un conjunto característico de péptidos trípticos que se separan por MALDI-TOF y su

Resultados

tamaño molecular y carga se determinan por espectrometría de masas (MS), produciéndose un espectro característico para cada proteína.

El patrón de péptidos obtenido se introdujo en la base de datos MASCOT y se comparó con el resto de proteínas incluidas en dicha base de datos. Las búsquedas se realizan introduciendo un margen de error en daltons para cada péptido encontrado. Cuanto menor sea el error y mayor sea el número de péptidos coincidentes en tamaño, mayor es la probabilidad de una identificación correcta de la proteína.

La obtención de resultados positivos depende de que proteínas muy semejantes hayan sido secuenciadas y por lo tanto sean conocidas las masas de sus fragmentos proteolíticos. Al introducir los fragmentos trípticos de las proteínas 1 y 2 en la base de datos obtuvimos que presentaban homología con proteínas de estrés de otras especies vegetales (Tabla IV.1), pero no conseguimos identificarlas ya que no se han secuenciado otras proteínas de estrés de chirimoya.

Mancha	n° de acceso	Proteína
1	gi 22530884	sHSP, <i>Lycopersicon esculentum</i>
1	gi 232276	18.8 kD class II HSP, <i>Ipomea nil</i>
1	gi 8671873	Semejante a 17.6 kD class I HSP, <i>Arabidopsis thaliana</i>
2	gi 123558	sHSP, chloroplast precursor, <i>Pisum sativum</i>
2	gi 232272	17.6 Class I HSP, <i>Helianthus annuus</i>
2	gi 15223730	Putativa HSP, <i>Arabidopsis thaliana</i>
2	gi 232276	18.8 kD class II HSP, <i>Ipomea nil</i>

Tabla IV.1. Proteínas de estrés con semejanzas en sus fragmentos trípticos con proteínas de estrés de chirimoya.

IV.3. Marcaje con [35S]-metionina de proteínas de nueva síntesis inducidas por tratamientos a bajas temperaturas.

Para estudiar el efecto que tienen las bajas temperaturas en la expresión de proteínas en mesocarpio de chirimoya, después de la recolección las chirimoyas se inyectaron en una zona del mesocarpio con [³⁵S]-metionina y se almacenaron durante 24 horas a 4 °C, una temperatura que produce daños por frío, posteriormente se mantuvieron a 20 °C para permitir la maduración de los frutos.

Las proteínas marcadas con [³⁵S]-metionina, que se sintetizan en mayor concentración después de los tratamientos de estrés, se analizaron mediante electroforesis bidimensional de extractos de mesocarpio de chirimoya. Tras la electroforesis, las proteínas marcadas con ³⁵S se detectaron mediante autorradiografía y se identificaron mediante técnicas de MALDI-TOF y espectrometría de masas.

La figura IV.10 muestra la autorradiografía de un gel de un extracto de un fruto control que se conservó a 4 °C durante dos días y de un fruto que se conservó a 4 °C durante 24 horas y posteriormente se almacenó durante dos días a 20 °C. Se puede observar un mayor marcaje de proteínas en los frutos almacenados a 4 °C que en los frutos controles.

Las proteínas más abundantes se digirieron con tripsina y se analizaron con MALDI-TOF para su posible identificación. Los fragmentos trípticos obtenidos tras la digestión se compararon con el tamaño de los fragmentos trípticos de otras proteínas incluidas en la base de datos MASCOT. No conseguimos identificar las proteínas inducidas por el tratamiento de estrés pero si obtuvimos que algunas de las proteínas seleccionadas presentaban una alta homología con otras proteínas de estrés de otras especies vegetales (Tabla IV.2).

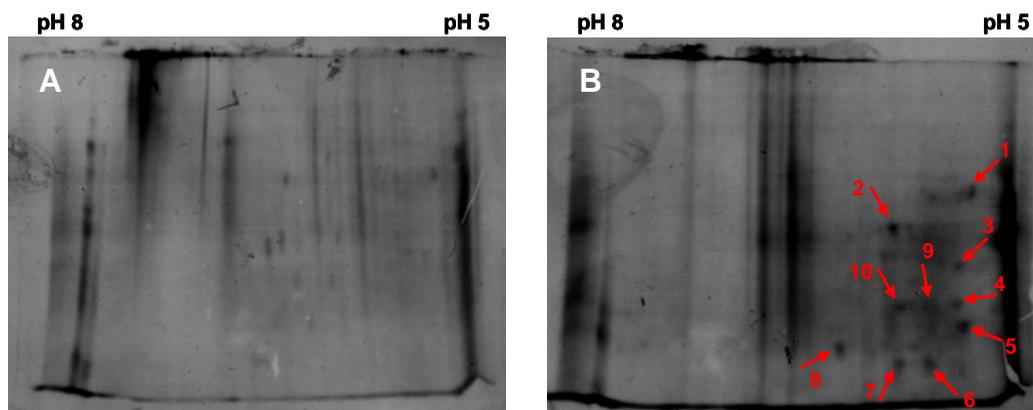


Figura IV.10: Autorradiografía de proteínas marcadas con [^{35}S]-metionina y separadas por electroforesis bidimensional. Las muestras de proteínas se obtuvieron de un fruto control que se conservó a 20 °C durante dos días (A) y de un fruto almacenado a 4 °C durante 24 horas y posteriormente almacenado durante dos días a 20 °C (B). Las flechas señalan las proteínas analizadas mediante MALDI-TOF.

La tabla IV.2. muestra las proteínas de estrés con semejanzas en sus fragmentos con las proteínas de estrés inducidas por las bajas temperaturas.

Mancha	n° de acceso	Proteína	% secuencia
3	Q9ZP24	Precursor de HSP23.6, <i>Triticum aestivum</i>	38%
	Q9ZSY0	HSP17.2IC clase I, <i>Funaria hygrometrica</i>	41%
	T05541	HSP23.6 clase M, <i>Arabidopsis thaliana</i>	39%
	Q6Z2L3	Putativa HSP 16.9, <i>Oryza sativa</i>	15%
4	Q9ZP24	Precursor de HSP23.6, <i>Triticum aestivum</i>	51%
	T09248	HSP23.5 clase M, <i>Picea glauca</i>	58%
5	T09248	HSP23.5 clase M, <i>Picea glauca</i>	54%
	Q8L5D7	sHSP, <i>Picea glauca</i>	46%
9	Q8L7T2	sHSP, <i>Lycopersicon esculentum</i>	50%
	T05541	HSP23.6 clase M, <i>Arabidopsis thaliana</i>	50%

Tabla IV.2. Proteínas de estrés con semejanzas en sus fragmentos trípticos con proteínas de estrés de chirimoya.

IV.4. Identificación de genes de estrés

Para tratar de identificar los genes que se inducían por el tratamiento con CO₂ y frío se analizaron mediante RT-PCR muestras de frutos controles y de frutos tratados. Para el diseño de oligonucleótidos se alinearon secuencias de sHSPs de distintas especies vegetales (Anexo I) y se diseñaron oligonucleótidos que hibridan en el dominio α -cristalino que es la zona de mayor homología. La figura IV.11 muestra un esquema de la posición de los oligonucleótidos utilizados (Tabla III.2) dentro de la secuencia de sHSP.

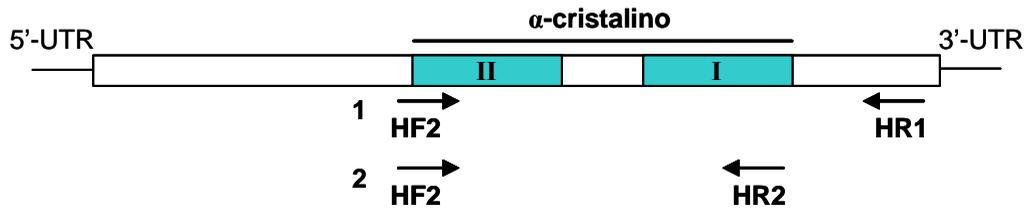


Figura IV.11. Localización de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-PCR para la localización de genes correspondientes a sHSPs.

Para la primera reacción de PCR se utilizó la pareja de oligonucleótidos HF2/HR1 que nos permitió amplificar el dominio α -cristalino y la extensión C-terminal (≈ 278 pb). Para la segunda reacción de PCR se utilizó la pareja HF2/HR2 que permite amplificar el dominio α -cristalino completo (≈ 233 pb).

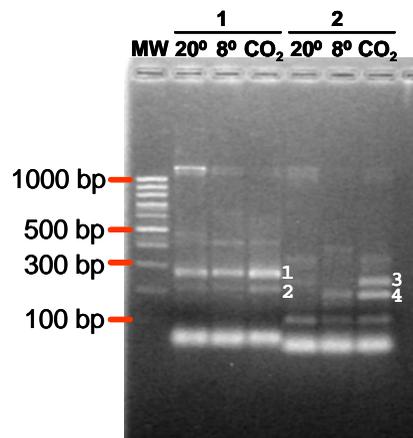


Figura IV.12. RT-PCR de RNA total extraído de mesocarpio de chirimoya expuesto a distintos tratamientos: 20 °C durante 2 días (20°), 8 °C durante 2 días (8°) y 20% de CO₂ + 8 °C durante 2 días (CO₂). Las parejas de oligonucleótidos utilizadas son HF2/HR1 (1) y HF2/HR2 (2).

En la figura IV.12 se muestra el resultado de estos experimentos, se pueden observar bandas amplificadas en frutos tratados que no aparecen o aparecen con mucha menor intensidad en frutos controles. Dichas bandas se cortaron del gel de agarosa, se purificaron, se clonaron en el vector pST1-blue y se secuenciaron.

```

1                                                    56
1  AAGGCTGACCTGCCTGGGCTGAAGAAGGAGGAGGTGAAGGTGGAGGTGGAGGACGG
2  AAGGCTGACCTGCCTGGGCTGAAGAAGGAGGAAGTGAAGGTGGAGGTGGAGGAAGG
3  AAGGCTGACCTGCCTGGGCTGAGGAAGGAGGAGGTGAAAGTGGAGGTGGAGGATGG
4  AAGGCTGACCTGCCTGGGCTG-----TTGCGCAGCG
Consenso AAGGCTGACCTGCCTGGGCTGAAGAAGGAGGAGGTGAAGGTGGAGGTGGAGGA GG

57                                                    112
1  GAGAGTTCTCCAGATCAGCGGCGAAAGAAGCAGGGAGAAAGAAGAGAAGAACGACA
2  GAGGATCCTCCAGATCAGCGGCGAAAGAAGCAGGGAGAAAGAAGAGAAGAACGACA
3  GAGAGTTCTCCAGATCAGCGGCGAGCGGAGCAGGGAGATGGAAGAGAAGCAGACA
4  -----CCTCGATCTCGTCGGCCCTATTGTCGAACAGCCTGAGTACAATCTTTTCA
Consenso GAGAGTTCTCCAGATCAGCGGCGAAAGAAGCAGGGAGAAAGAAGAGAAGCAGACA

113                                                    168
1  AGTGGCACCGTGTGGAGAGGAGCAGCGGCAAATTCCTCCGCCGGTTCGGCTCCCC
2  AGTGGCACCGTGTGGAGAGGAGCAGCGGCAAATTCCTCCGCCGGTTCGGCTCCCC
3  CGTGGCACAGGATGGAGCGATCGAGTGGCAAATTCCTGAGGCGCTTAGGCTGCCG
4  ACAGGCACAAGGTTGAGA-----TCGAATACCTTCCGCTTTATAACAACCTAC
Consenso AGTGGCACCGTGTGGAGAGGAGCAGCGGCAAATTCCTCCGCCGGTTCGGCTCCCC

169                                                    224
1  GAAAATGCTAAGGTGGATCAGGTGAAGGCGGCCATAGAGAACGGGGTCTTGACGGT
2  GAAAATGCTAAGGTGGATCAGGTGAAGTC---CATCGAGATCTCT-----
3  GAGAATGCGAAGGTGGAGGGAGTGAAGGCGGCATGAGAAATGGTGTGCTTACCGT
4  GGTATTG----GTCTTACTACTTGGAGCC--CACTTGCTTCTGGTGTGCTTACCGT
Consenso GAAAATGCTAAGGTGGATCAGGTGAAGGCGGCCAT GAGAATGGTGTGCTTACCGT

225                                                    279
1  GACTGTGCCAAAAGAAGAAGTGAAGAAGTCAGAGGTGAAGTCCATCGAGATCTCT
2  -----
3  TACTGTTCC-----
4  TACTGTTCC-----
Consenso TACTGTTCC

```

Figura IV.13. Alineamiento de las secuencias amplificadas en las reacciones de RT-PCR (Figura IV.12) para la amplificación de genes correspondientes a sHSPs. En rojo se representan los nucleótidos conservados en todas las secuencias y en azul los nucleótidos conservados en la mayoría de las secuencias.

Resultados

La banda 1 (279 pb) y la banda 3 (233 pb) tienen el tamaño esperado, la banda 2, de 210 pb, se amplifica como consecuencia de la unión inespecífica del oligonucleótido HR2 (ver figura IV.13). La banda 4, de 187 pb, presenta muy poca homología con las otras 3 secuencias.

Las secuencias obtenidas se analizaron con el programa BLAST y se compararon con el resto de secuencias incluidas en la base de datos, obtuvimos que las bandas 1, 2 y 3 tenían una gran homología con sHSPs de otras especies vegetales y la banda 4 presentaba homología con un canal de potasio de *Arabidopsis thaliana* (tabla IV.3).

	Homología	n° de acceso	Identidad
1	<i>Ananas comosus</i> , class-1 LMW HSP mRNA	AY098528.1	82%
	<i>Cuscuta japonica</i> , LMW HSP mRNA	AB017273.1	81%
2	<i>Ananas comosus</i> , class-1 LMW HSP mRNA	AY098528.1	83%
	<i>Fragaria x ananassa</i> , LMW HSP mRNA	U63631.1	83%
3	<i>Helianthus annuus</i> 17.7 kDa HSP gene	U46545.1	79%
	<i>Nicotiana tabacum</i> , class I sHSP mRNA	AY329072.1	78%
4	<i>Arabidopsis thaliana</i> , potassium channel (KAB1) mRNA	NM_100349.3	78%
	<i>Arabidopsis thaliana</i> , putative potassium channel mRNA	AY091424.1	78%

Tabla IV.3. Proteínas homólogas a las bandas amplificadas por RT-PCR.

Las tres secuencias con homología con sHSPs corresponden al extremo carboxilo de las sHSPs y poseen los dos motivos conservados (consenso I y

consenso II) en sHSPs de plantas. Los resultados obtenidos parecen indicar que el tratamiento con CO₂ induce la expresión de sHSPs en mesocarpio de chirimoya.

Con el fin de amplificar fragmentos de cDNA de mayor tamaño y de esta forma poder caracterizar las sHSPs que se han inducido en mesocarpio de chirimoya por el tratamiento con CO₂, analizamos muestras controles y muestras de frutos tratados mediante RT-PCR, usando como oligonucleótido sentido el mismo que para las reacciones anteriores y como oligonucleótido antisentido un oligo-dT que se une a la cola de Poli-A del extremo 3' del cDNA (Figura IV.14).

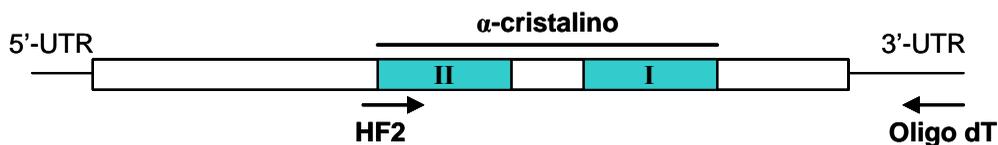


Figura IV.14. Esquema de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-PCR para la amplificación del extremo 3' de sHSPs.

Las muestras se separaron electroforéticamente en geles de agarosa del 2% tras las reacciones de PCR (figura IV.15). Las bandas que se amplificaron específicamente o con mayor intensidad en frutos tratados con CO₂ se clonaron en el sitio *Eco RV* del vector pST1-blue y se secuenciaron.

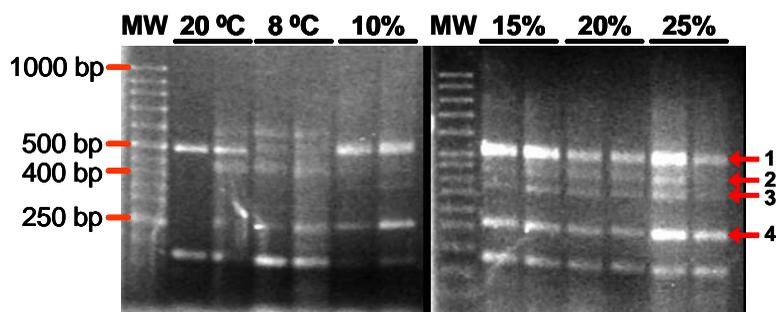


Figura IV.15. RT-PCR de RNA total extraído de mesocarpio de chirimoyas almacenadas en distintas condiciones: 2 días a 20 °C, 2 días a 8 °C y 2 días a 8 °C con la proporción de CO₂ indicada. La pareja de oligonucleótidos utilizada es HF2/Oligo dT. Las flechas señalan las bandas diferenciales obtenidas en frutos tratados con CO₂.

Al analizar las secuencias obtuvimos que en frutos controles a 20 °C se amplifica una banda de 500 pares de bases que presenta una gran homología con HSPs de bajo peso molecular de otras especies vegetales y se denominó HSP 1.

Al analizar las secuencias obtenidas de frutos que habían sido tratados con CO₂ obtuvimos que cada banda del gel correspondía a más de una secuencia. La banda 1 del gel correspondía a dos secuencias de 540 y 511 pares de bases que se denominaron HSP 2 Y HSP 3 respectivamente. La banda 2 del gel correspondía a tres secuencias de 460, 458 y 432 pares de bases, la secuencia de 432 pares de bases se denominó HSP 4, las secuencias de 460 y 458 pares de bases coinciden en secuencia con la secuencia HSP 1 y HSP 2 respectivamente pero tienen distinto tamaño porque difieren en la señal de poliadenilación utilizada (figura IV.16). La banda 3 del gel correspondía a tres secuencias de 400, 382 y 375 pares de bases, la banda de 382 pares de bases se denominó HSP 5 y al igual que en el caso anterior las bandas de 400 y 375 coinciden en secuencia con la secuencia HSP 1 y HSP 2

respectivamente pero tienen distinto tamaño porque difieren en la señal de poliadenilación utilizada (figura IV.16).

Además en todos los frutos tratados con CO₂ se amplifica una banda de 262 pares de bases (banda 4) que se produce como consecuencia de la unión del oligo dT utilizado en la reacción de PCR a una zona rica en adenina dentro de la secuencia HSP 2 (figura IV.16).

El uso de distintas señales de poliadenilación puede indicar un mecanismo regulador de la expresión de genes de estrés.

Resultados

1 57
hsp1 AAGGCTGACCTGCCTGGGCTGAAGAAGGAGGAGGTGAAGGTGGAGGTGGAGGACGGG
hsp2 AAGGCTGACCTGCCTGGGCTGAAGAAGGAGGAAGTGAAGGTGGAGGTGGAGGAAGGG
hsp3 AAGGCTGACCTGCCTGGGCTGAGGAAGGAGGAGGTGAAAGTGGAGGTGGAGGATGGG
hsp4 AAGGCTGACCTGCCTGGGCTGAAAAGGAGGAGGTGAAAGTGGAGGTGGAGGACGGG
hsp5 AAGGCTGACCTGCCTGGGCTGAAGAAGGAGGAGGTGGAGGTGGAGGTGGAGGACGGG
Consenso AAGGCTGACCTGCCTGGGCTGAAGAAGGAGGAGGTGAAGGTGGAGGTGGAGGACGGG

58 114
hsp1 AGAGTCCTCCAGATCAGCGGCGAGCGGAGCAGGGAGTTGGAAGAAAGAATGATACG
hsp2 AGGATCCTCCAGATCAGCGGCGAAAGAAGCAGGGAGAAAGAAGAGAAGAACGACAAG
hsp3 AGAGTTCTCCAGATCAGCGGCGAGCGGAGCAGGGAGATGGAAGAGAAGCACGACACG
hsp4 AGAGTTCTCCATATCAGCGGTGAGCGGAGCAGGGAGAAGGAGGAGAAGAACGACAGG
hsp5 AGAGTGCTCCGATCAGCGGCGAGCGGTGCAGGGGGAAGGAAGAGGAGAACGACAAG
Consenso AGAGT CTCCAGATCAGCGGCGAGCGGAGCAGGGAGAAGGAAGAGAAGAACGACA G

115 171
hsp1 TGGCACAGGGTGGAGAGGTTCGAGCGGCAAGATTTCCTGAGGCGTTTTAGGCTGCCGGAG
hsp2 TGGCACCGTGTGGAGAGGAGCAGCGGCAAAATTCCTCCGCCGTTCCGGCTCCCCGAA
hsp3 TGGCACAGGATGGAGCGATTCGAGTGGCAAATTCCTGAGGCGTTTTAGGCTGCCGGAG
hsp4 TGGCACAGGGTGGAGAGGTTCGAGTGGCAAATTCAGAGGCGTTCCAGGCTGCCGGAG
hsp5 TGGCACAGGGCGGAGAGGTTCGAGCGGCAAAATTCAGAGGCGTTTTAGGCTGCCTGAG
Consenso TGGCACAGGGTGGAGAGGTTCGAGCGGCAAAATTCCTGAGGCG TTTAGGCTGCCGGAG

172 228
hsp1 GATGCCAGGGTGGAGGGAGTGAAGGCGGCGATGGAGAACGGAGTGCTGACGGTGACC
hsp2 AATGCTAAGGTGGATCAGGTGAAGGCGGCCATAGAGAACGGGTCCTGACGGTGACT
hsp3 AATGCAAGGTGGAGGGAGTGAAGGCGGCGATGGAGAAATGGAGTGCTGACGGTGACC
hsp4 AATGCAAGGTGGAGGGAGTGAAGGCGGCGATGGAGAACGGAGTGCTGACGGTGACC
hsp5 AATGCAAGGTGGAGGGAGTGAAGGCGGCGATGGAGAACGGAGTTCTTACGGTGACC
Consenso AATGC AAGGTGGAGGGAGTGAAGGCGGCGATGGAGAACGGAGTGCTGACGGTGACC

229 285
hsp1 GTGCCAAGGTGGAGGTGAAGAAGGCGGACGTCAAAGCCATCGACATCACTGGCTAA
hsp2 GTGCCAAAAGAAGAAGTGAAGAAGTCAAGGTTGAAAGCAATCGAAATCTCTGGCTAG
hsp3 ATGCCTAAGGAGGGGGTGAAGAAGGCGGACGTCAAAGCCATCCAAATCTCTGGCTGA
hsp4 GTGCCAAGGAAGGGGTGAAGAAGGCGGACGTTAAAACCATCGATATCTCGGGTTAA
hsp5 GTGCCAAGGAAGGGGTGAAGAAGCCCAACATCAAAGCAATCGAAATCTCTGGCTAG
Consenso GTGCCAAGGAAGGGGTGAAGAAGGCGGACGTCAAAGCCATCGAAATCTCTGGCTAA

```

                286                                     342
hsp1 AGAA---AGAAACATGTGGCTTACAT--CTTTACTTCGCTTGCTGTGTGAAATATC
hsp2 CTC-----ATCAA--AGCAATCAAACAACGCTTCCGC AATAAA TCTAGAACGTAGC
hsp3 AGAA---AGAA-CAAGAGCTTGCGGCTA-CCTTCCTTC-CTCCTCCTCCGAAATATC
hsp4 AGAA---AGAA-CTAGTGCCTCCACTGAGCATGACCTCACATGCCCTTGTGACTCTC
hsp5 CACTCACAGATTAATAAACAAATCAATAAA TAAAACGCCATACTTCAAATAA-TAAT
Consenso AGAA  AGAA CA GAGC T CA ATA C TTACCTC CT  TCT  AA TATC
    
```

```

                343                                     399
hsp1 TTTTTTGTATGGCTT--TTGCTGTGGTTTTCGTTTCTACCG-----GAG
hsp2 AGGTT-GATTATCATG-TTGTGTGTGTTTGTCTTGTGTG---GAT-----CGAG
hsp3 TTTCT-GAATGGTTTGTTTGATGTCGTTTTGTTTTATGCATCTGCCGACGGCCGAG
hsp4 TTTTT-GAATTGCAT----GTTTTGGTGTTCGTACTACAGCTAAAT-----
hsp5 AATAA-TAATACCAA-AAAAAAAAAGCCCTATAGTGTGATC---GT-----
Consenso TTTTT GAAT GCAT  TTG TGTGGTTTTG T  TA G      G      GAG
    
```

```

                400                                     456
hsp1 TGCTATGGGCTTTCTTGACACCGTATACATGTAGTGTCTGTATACTACTACCGTCTT
hsp2 TGTGAATTTAGAGAGTGCAAC AATAAA AAAAGTATGAAATCGTGAGTGCCGTGTATG
hsp3 TGTTATGGGTTTTCTTGCCCTGTATGTGTATTGTAG-TGCACCTTCTACTCTGTT
hsp4 -----
hsp5 -----
Consenso TG  A          TG  C  TA          T      T      T  C      T
    
```

```

                457                                     513
hsp1 GGAGTTAA AATAAATGGATGTGGTTTTTGGCTTGCCAAAAAAAAAAAAAGCCCTATAGT
hsp2 TGACCATATTTGAATATGCAAGGCGAAAGAGTGATTAATTAAATTCTGGCATGAAGG
hsp3 AGAACTAA A- TAAATAAATGGAAC TTGCTCTC CAAAAAAAAAAAAAGCCCTATAGT
hsp4 ----- AAATGAATGTAATCTTGGCTTCCAAAAAAAAAAAAAGCCCTATAGT
hsp5 -----
Consenso GA  A  TAAAT  ATG      T      GCTT CAAAAAAAAAAAAAGCCCTATAGT
    
```

```

                514                                     559
hsp1 GAGTCGT-----
hsp2 AAGTTTGATGGTTAGCCAAAAAAAAAAAAAGCCCTATAGTGTGATCGT
hsp3 GAGTCGT-----
hsp4 GAGTCGT-----
hsp5 -----
Consenso GAGTCGT
    
```

Figura IV.16 Alineamiento de las secuencias amplificadas mediante RT-PCR (figura IV.15). En rojo se representan los nucleótidos conservados en todas las secuencias y en azul los nucleótidos conservados en la mayoría de las secuencias. En amarillo se representan las señales de poliadenilación y en verde se representan las señales de poliadenilación alternativas.

	Homología	n° de acceso	Identidad
HSP1	<i>Daucus carota</i> 17 kDa HSP cognate mRNA	U47094.1	80%
	<i>Helianthus annuus</i> 17.7 kDa HSP gene	U46545.1	79%
HSP2	<i>Cuscuta japonica</i> mRNA for LMW HSP	AB017273.1	81%
	<i>Ageratina adenophora</i> 17.7 KD class I sHSP mRNA	EF105483.1	78%
HSP3	<i>Agave tequilana</i> chaperone mRNA,	DQ515781.1	78%
	<i>Helianthus annuus</i> 17.7 kDa HSP	U46545.1	76%
HSP4	<i>Fragaria x ananassa</i> LMW HSP mRNA	U63631	77%
	<i>Ageratina adenophora</i> 17.7 KD class I sHSP mRNA	X13431.1	77%
HSP5	<i>Triticum aestivum</i> HSP 16.9C mRNA	U63631.1	80%
	Wheat mRNA for putative LMW HSP	EF105483.1	79%

Tabla IV.4. Proteínas homólogas a las bandas amplificadas por RT-PCR correspondientes a las secuencias mostradas en la Figura IV.15.

Para conocer el extremo amino de las sHSPs de chirimoya inducidas por el tratamiento se utilizó la técnica de 5' RACE siguiendo el protocolo descrito en el apartado III.2.3.6. Para la primera reacción de PCR se utilizó el oligonucleótido HR3 que hibrida 12 pares de bases después del oligo HF2 pero en sentido inverso, y para la segunda reacción de PCR se utilizó el oligonucleótido HF2R que es igual que el oligonucleótido HF2 pero en sentido inverso (Figura IV.18).

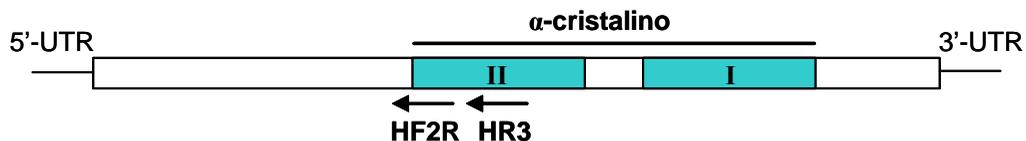


Figura IV.18. Esquema de los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR para la amplificación del extremo 5' de sHSPs mediante la técnica de RACE 5'.

La banda diferencial obtenida en los frutos tratados con CO_2 (Figura IV.19) se clonó en el sitio Eco RV del vector pST1-blue y se secuenció. La secuencia obtenida (Figura IV.20) se analizó mediante BLAST y obtuvimos que presentaba gran homología con el extremo amino de sHSPs de clase I de otras especies vegetales.

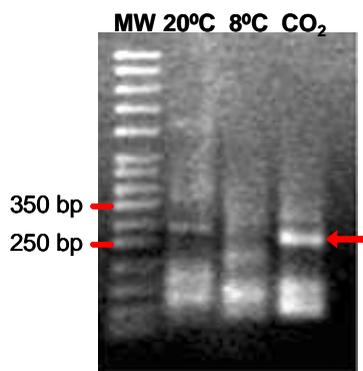


Figura IV.19. Resultados de un experimento de amplificación del extremo 5' mediante la técnica de RACE. Se utilizaron muestras de mesocarpio de chirimoyas almacenadas en distintas condiciones: 2 días a 20 °C, 2 días a 8 °C y 2 días a 8 °C en 20 % de CO_2 .

```

AACTGGAAGAATTCGCGGCCGCAGGAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTACTCATTTCCTAGTTTC
                                                                L I P S F
TTCGGTGGTTCGTCGGTCCAACGTCTTCGACCCTTTTTCCCTCGATGTGTGGGATCCGTTTCGAGGGC
F G G R R S N V F D P F S L D V W D P F E G
TTCCCCTTCAACACGTCACTGGCCCGATCTGGCTCCGCTAGAGAAACGTCTCAGTTCGCGAACACA
F P F N T S L A R S G S A R E T S Q F A N T
CAGATCGACTGGAGGGAGACTCCCGAAGCGCACGTCTTCAAGGCTGACCTGCCTGGGCTG
Q I D W R E T P E A H V F K A D L P G L

```

Figura IV.20. Secuencia de nucleótidos de la banda señalada en la figura IV.19 correspondiente a un fruto tratado durante 2 días a 8 °C en una atmósfera del 20 % de CO₂. En la segunda línea se muestra la secuencia polipeptídica correspondiente. En azul se representan los oligonucleótidos empleados.

Con la secuencia obtenida del extremo 5' pudimos amplificar una sHSP de chirimoya casi completa utilizando como oligo sentido un oligonucleótido que hibrida en la región 5' obtenida, el oligo HF5 (tabla III.2), y como oligonucleótido antisentido un oligo-dT que se une a la cola de Poli-A del extremo 3' del cDNA (Figura IV.21).

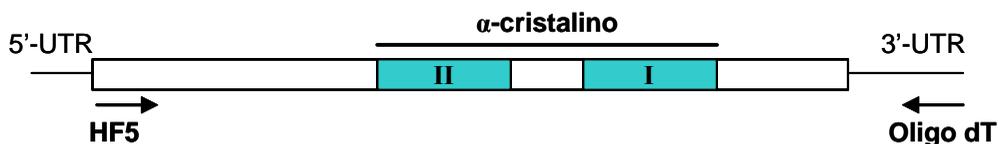


Figura IV.21. Esquema de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de RT-PCR para la amplificación del extremo 3' de sHSPs.

Como resultado de este PCR obtuvimos una sola banda de 720 pb que se clonó en el vector pST1-blue y se secuenció. La secuencia obtenida (figura IV.22) corresponde a la primera sHSP de clase I de chirimoya.

ACTCATTTCCTAGTTTCTTCGGTGGTCGTCGGTCCAACGTCTTCGACCCTTTTTCCCTCGATGTGTG
GGATCCGTTTCGAGGGCTTCCCCTTCAACACGTCACTGGCCCGATCTGGCTCCGCTAGAGAAACGTC
TCAGTTTGCGAACACACAGATCGACTGGAGGGAGACTCCCGAAGCGCACGTCTTCAAGGCCGACCT
GCCGGGTCTAAGGAAGGAGGAGGTGAAGGTGGAGGTGGAGGACGGGAGGGTTCCTCAGATCAGCGG
GGAGCGGAGCAGGGAGAAGGAAGAGAAGAACGACACGTGGCATAGAGTGGAGAGGTTCGAGCGGCAA
GTTCTGAGGCGGTTCCGGCTGCCGACAACGCGAAGGTGGACGGAGTAAAGGCGGCGATGGAGAA
TGGAGTGCTGACGGTACTGTTCCCAAGGAGGAGGTGAAGAAGGCCAATGTCAGAGCCATCGATAT
CTCTGGGTAAaagacagagaagcgcgtacgtgggagcgaagggcaaatccgctgacctgctgtgcc
tgtgtgatttgtttttgggctaagttgttttctctgttctctagtgtttggaatgttcttggca
gtatgaaatgaagcgtgtctactgctctgtcatggagctaaataaacgaaatgtaaattcttagtgag
aatgtattgtaaattgctagaggggtttttccaaaaaaaaaaaaagccctatagtgagtcgt

Figura IV.22. Secuencia de nucleótidos de sHSP de chirimoya obtenida mediante RT-PCR (figura IV.21). En negrita se representa el codón de terminación y en minúscula la región 3' no traducida. En azul se representan los oligonucleótidos empleados en la reacción de PCR.

El producto de traducción de la secuencia obtenida se alineó con otras sHSPs de clase I de otras especies vegetales y comprobamos que presentaba una gran homología con ellas (Tabla IV.5). En el extremo amino presenta el motivo conservado en sHSPs de esta clase y además presenta los dos motivos muy conservados (consenso I y consenso II) del dominio α - cristalino de todas las sHSPs (Figura IV.23).

En la figura IV.23 se puede observar que en la secuencia de chirimoya faltan los dos primeros aminoácidos, puede explicarse por la existencia de alguna estructura secundaria en el extremo 5' del cDNA que impide la retrotranscripción de esta región.

	Homología	n° de acceso	identidad
1	Ananas comosus class-1 LMW HSP mRNA	AY098528	78%
2	Fragaria x ananassa LMW HSP mRNA	U63631	76%
3	Helianthus annuus 17.7 kDa HSP	U46545	78%
4	Lycopersicon esculentum 17.7 kD class I sHSP	AF123255	77%
5	Triticum aestivum HSP 16.9C	L14444	79%
6	Cuscuta japonica mRNA for LMW HSP	AB017273	74%
7	Agave tequilana clone 6.26 chaperone mRNA	DQ515781	76 %
8	Daucus carota HSP	X53851	73%
9	Glycine max HSP18.5-C	X07160	73%
10	O. sativa 16.9 kDa HSP	M80939	74%
11	Arabidopsis thaliana 17.4kDa HSP	X17293	77%
12	Nicotiana tabacum cytosolic class I sHSP	AY329072	77%

Tabla IV.5. Proteínas homólogas a la sHSP de clase I de chirimoyo (Figura IV.22). Los números de acceso corresponden a la base de datos Pubmed (www.ncbi.nlm.nih.gov). **1-** Neuteboom *et al.*, 2002; **2-** Medina-Escobar *et al.*, 1998; **3-** Coca *et al.*, 1996; **4-** Vlachonassios *et al.* (no publicado); **5-** Nguyen *et al.* (no publicado); **6-** Yamada, 1998 (no publicado); **7-** Nieto-Sotelo *et al.* (no publicado); **8-** Darwish *et al.*, 1991; **9-** Raschke *et al.*, 1988; **10-** Tzeng *et al.*, 1992; **11-** Takahashi *et al.*, 1989; **12-** Volkov *et al.*, 2005.

Resultados

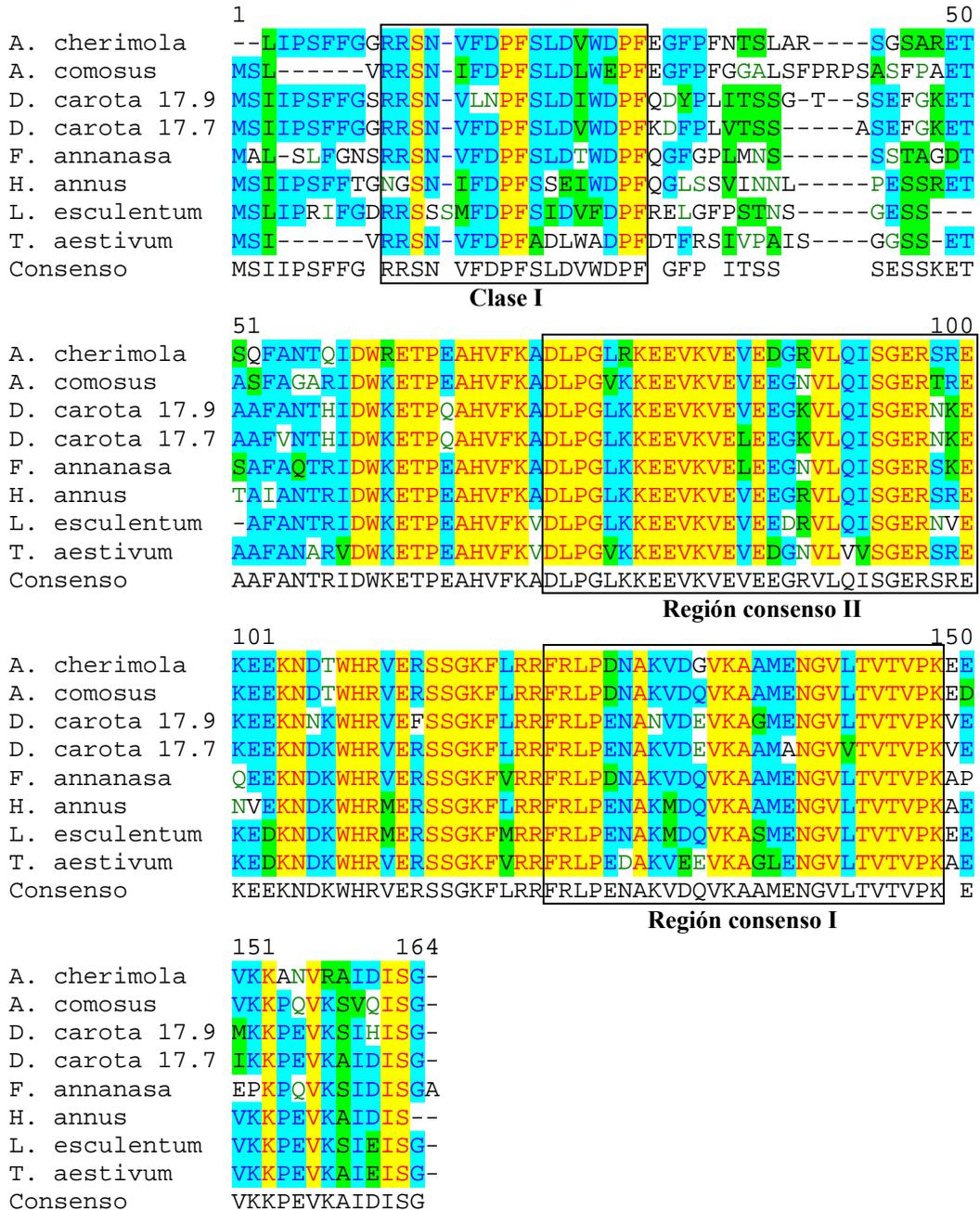


Figura IV.23. Alineamiento de la secuencia del posible producto de traducción de la sHSP de chirimoyo con las de sHSPs de clase I de otras especies vegetales.

IV.4. Expresión heteróloga en bacterias.

Con el objetivo de estudiar la función de la sHSP de chirimoyo nos propusimos su expresión en bacterias. Para ello, se utilizó el plásmido pQE que permite obtener la proteína de interés fusionada a una cola de histidinas en el extremo amino que facilita su posterior purificación.

Para realizar la construcción, se partió de la secuencia de la sHSP de chirimoyo clonada en pST1-blue y se clonó en fase de lectura con las histidinas del vector pQE-31. Para ello, se utilizaron los sitios KpnI y HindIII del sitio múltiple de clonación (MCS) de pST1-blue (Figura IV.24).

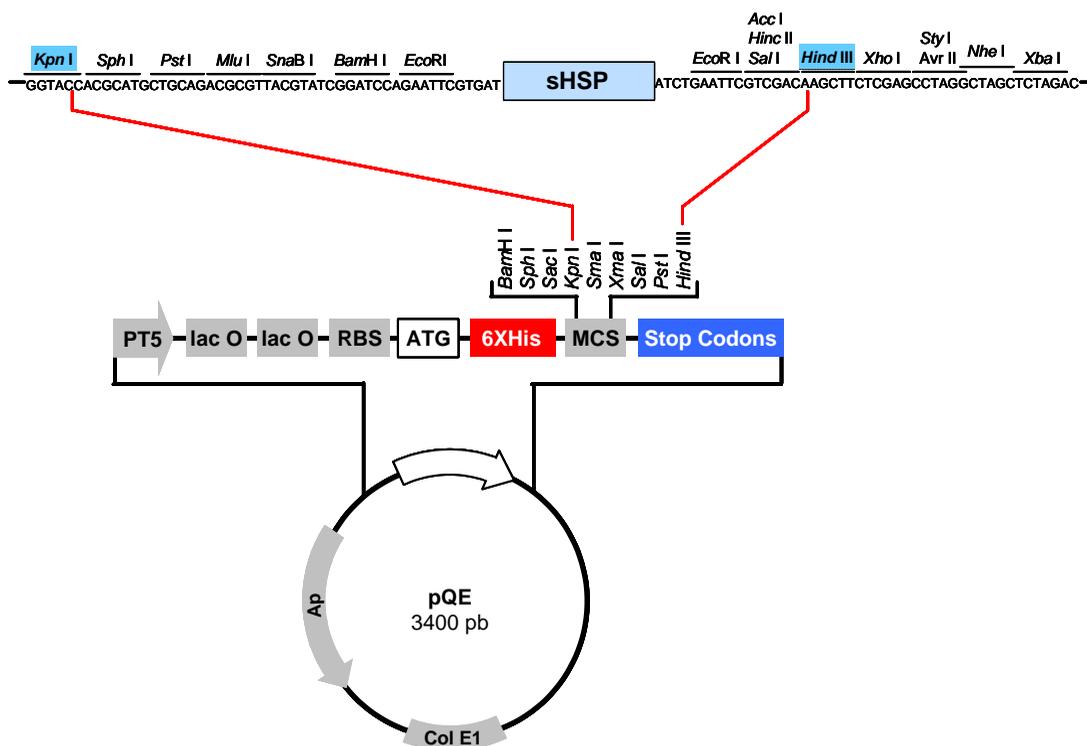


Figura IV.24. Subclonación de la sHSP de chirimoyo en el vector pQE-31 para su expresión heteróloga en bacterias. La secuencia de sHSPs se ha clonado en los sitios KpnI y HindIII del sitio múltiple de clonación del vector pQE-31.

Resultados

Una vez obtenida la construcción, se secuenció para comprobar que era correcta y se transformó en *Escherichia coli* XL1-blue para su expresión. La expresión de la proteína está controlada por el promotor del fago T5 que es reconocido por la RNA polimerasa de *Escherichia coli* y está regulada por dos operadores del operón *lac*. La figura IV.25 muestra la expresión de la proteína a distintos tiempos desde su inducción.

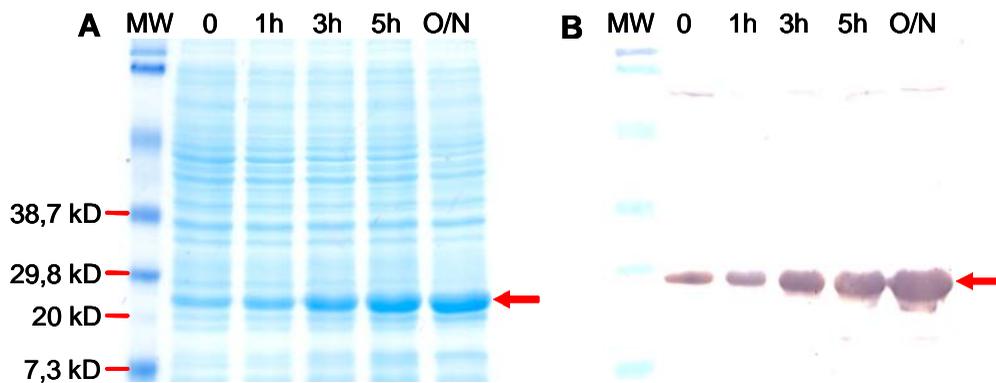


Figura IV.25. Expresión de la sHSP de chirimoyo en *Escherichia coli* XL1-blue. **A.** SDS-PAGE. **B.** Western blot utilizando un anticuerpo anti HSP 17.6 Clase I de semillas de girasol.

Para comprobar que la proteína que se estaba induciendo era una proteína de estrés, se realizó un western blot con anticuerpos frente a una sHSP de clase I, HSP 17.6 de semillas de girasol (Figura IV.25.B).

Como se puede ver en la figura IV.25, antes de añadir IPTG ya hay una pequeña concentración de la proteína indicando que la síntesis es ligeramente activa. Esto es debido a que la cepa XL1-blue de *E. coli* no produce suficiente

cantidad de represor lac para bloquear al potente promotor T5. Esto no constituye ningún problema ya que la proteína que se está induciendo no es tóxica para la bacteria.

IV.5. Efecto protector de una sHSP de chirimoyo expresada en *E. coli* durante diferentes situaciones de estrés.

El efecto de la expresión de la proteína de estrés de chirimoyo en la supervivencia de *Escherichia coli* se estudió sometiendo los cultivos bacterianos transformados a distintos tipos de estrés.

IV.5.1. Estrés por elevadas temperaturas.

Se han realizado experimentos para ver el efecto de la sHSP de chirimoyo tanto *in vitro*, estudiando su papel estabilizador de proteínas en disolución como *in vivo* determinando su efecto sobre la tasa de supervivencia bacteriana.

IV.5.1.1. Análisis de la estabilidad termal de proteínas de *Escherichia coli*.

Con este experimento pretendíamos saber si la sHSP de chirimoyo con la que se han transformado las bacterias tiene actividad chaperona *in vitro*. Extractos bacterianos completos de *Escherichia coli* transformadas con el vector pQE-31 (controles) y de bacterias que sobreexpresan la sHSP de chirimoyo se calentaron a distintas temperaturas (30 °C a 100 °C) durante 15 minutos. Posteriormente se centrifugaron para eliminar las proteínas desnaturalizadas y agregadas.

Las proteínas que permanecían solubles después del calentamiento se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura IV.26). En los extractos controles se

Resultados

observó una disminución de la cantidad de proteínas solubles a partir de 60 °C y a 80 °C solo quedaban algunas proteínas que incluso permanecían solubles a 100 °C. La presencia de la sHSP modificó este efecto y se pudo observar que la mayoría de proteínas permanecieron solubles hasta los 70 °C y que, incluso a 80 °C y 90 °C, había una gran cantidad de proteínas solubles, superior a la de los extractos controles.

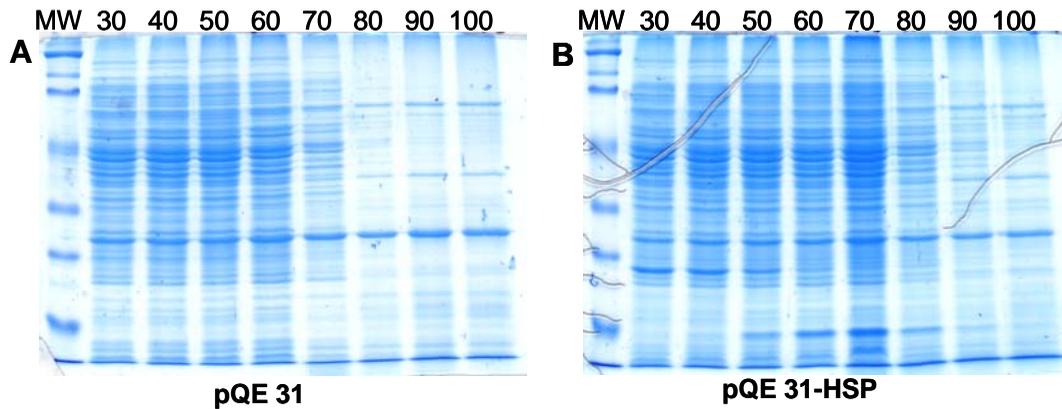


Figura IV.26. Proteínas solubles de *E. coli* después de calentar durante 15 minutos a la temperatura indicada.

Se realizó el mismo experimento anterior pero incrementando el tiempo de calentamiento a 30 minutos y se observó el mismo efecto protector por la presencia de la sHSP de chirimoyo pero a temperaturas inferiores (Figura IV.27). En los extractos controles, el contenido de proteínas solubles empezó a disminuir a 60 °C mientras que en los extractos con sHSP se observó el descenso a partir de 70 °C.

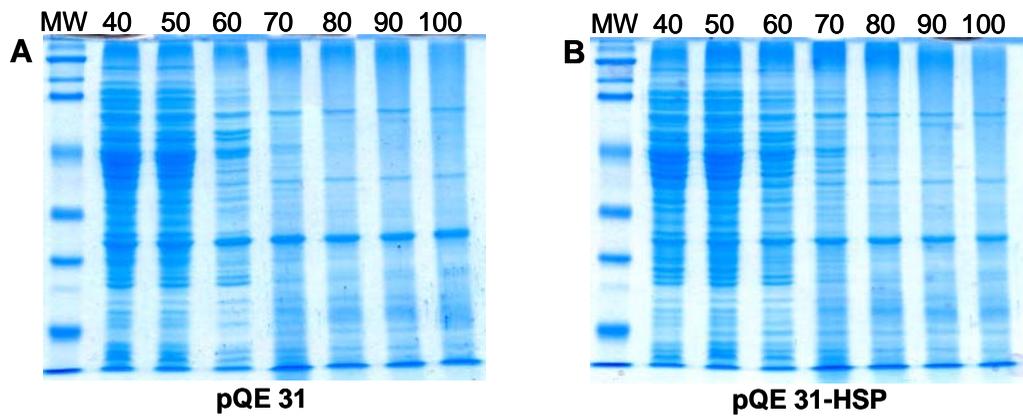


Figura IV.27. Proteínas solubles de *E. coli* después de calentar durante 30 minutos a la temperatura indicada.

IV.5.1.2. Análisis de la supervivencia bacteriana a elevadas temperaturas

Se partió de un cultivo control (bacterias transformadas con el plásmido pQE-31) y un cultivo que sobreexpresa la proteína de estrés, tres horas después de la inducción de la proteína, los cultivos se diluyeron hasta una DO_{600} de 0,6 y se incubaron en un baño a 50 °C, una temperatura que causa lisis celular.

A distintos tiempos después de la aplicación del tratamiento se tomaron alícuotas del cultivo y se determinó la viabilidad celular contando el número de colonias después de la incubación durante toda la noche a 37 °C. Los resultados se muestran en la Figura IV.28.

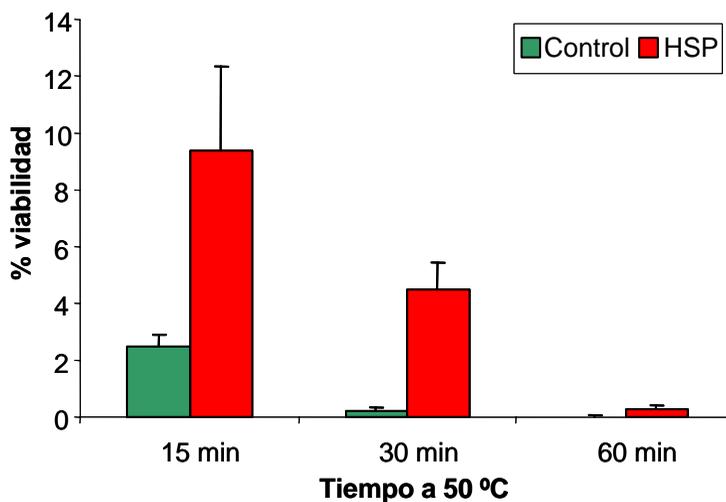


Figura IV.28. Influencia de la expresión de la sHSP de chirimoyo en la viabilidad de *E. coli* a 50 °C. La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de unidades formadoras de colonias con respecto al número de unidades formadoras de colonias en el tiempo 0.

A todos los tiempos de tratamiento a 50 °C disminuyó la viabilidad celular en ambos cultivos (Figura IV.28), pero esta disminución fue mucho menor en bacterias que sobreexpresaron la proteína de estrés. Después de 15 minutos de tratamiento, la supervivencia de las bacterias que expresan la proteína es 4 veces mayor que la de las bacterias controles. Esta diferencia se hizo mucho mayor después de 30 minutos de tratamiento, en este tiempo solo el 0,2 % de las bacterias controles sobrevivieron mientras que las bacterias que expresan la proteína de estrés sobrevivieron en un 4,5 %, es decir, la supervivencia de las bacterias que expresan sHSPs fue 20 veces mayor que la de las bacterias controles. Después de 60 minutos a 50 °C la viabilidad celular era muy pequeña, pero la supervivencia de las bacterias controles siempre fue menor que la de las bacterias que expresan la proteína de estrés.

IV.5.2. Estrés por bajas temperaturas.

Para estudiar el efecto de la expresión de la sHSP de chirimoyo en la supervivencia de *Escherichia coli* a bajas temperaturas, tres horas después de la inducción de la proteína, los cultivos se sembraron en placas y se incubaron a 0 °C durante 3, 5, 7 y 10 días. Pasado este tiempo, las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche y se determinó la viabilidad celular. Los resultados se muestran en la figura IV.29.

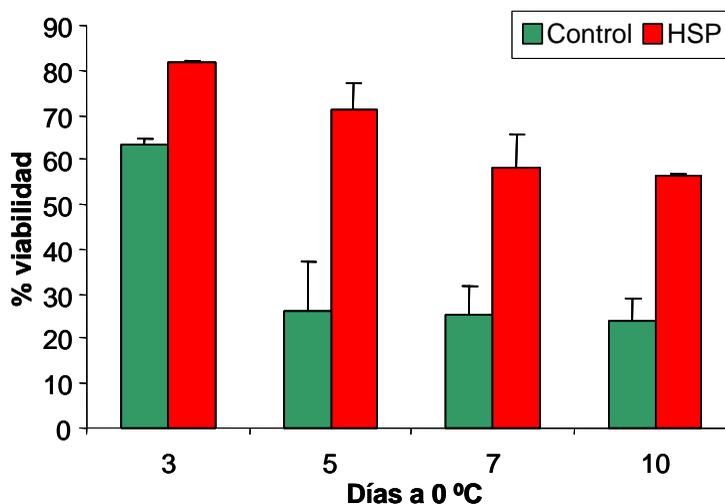


Figura IV.29. Influencia de la expresión de la sHSP de chirimoyo en la viabilidad de *E. coli* a 0 °C. La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de unidades formadoras de colonias con respecto al número de unidades formadoras de colonias en el tiempo 0.

Como se muestra en la figura IV.29 la incubación a 0 °C produjo pérdida de viabilidad de ambos cultivos a todos los tiempos ensayados, pero fue mucho más lenta en bacterias que sobreexpresaron la proteína de estrés. Después de 5 días a 0 °C, solo sobrevivió un 26 % de las bacterias controles, sin embargo, las bacterias

con la proteína de estrés sobrevivieron en un 71%. Esta diferencia se mantuvo hasta el final del tratamiento, después de 10 días a 0 °C, solo sobrevivió un 23 % de bacterias controles, mientras que después del mismo periodo de tiempo sobrevivió un 56 % de las bacterias que sobreexpresan la sHSP.

IV.5.3. Estrés oxidativo.

Para estudiar el efecto protector de la sHSP de chirimoyo frente al estrés oxidativo, tres horas después de la inducción, los cultivos se diluyeron hasta una D.O.₆₀₀ de 0,6 con LB suplementado con H₂O₂ en una concentración final de 1mM y se dejaron crecer a temperatura ambiente con agitación. En paralelo se realizó otro cultivo idéntico pero sin H₂O₂.

A distintos tiempos después de la aplicación del tratamiento se tomaron alícuotas del cultivo y se determinó la viabilidad celular contando el número de colonias después de la incubación durante toda la noche a 37 °C.

La figura IV.30 muestra cómo afecta el H₂O₂ a la viabilidad de *E. coli*. La adición de H₂O₂ al medio de cultivo disminuyó la viabilidad del cultivo control y del cultivo que sobreexpresa la proteína de estrés pero con diferente intensidad. Después de media hora de tratamiento sólo sobrevivió un 25 % de las bacterias controles, en este mismo periodo de tiempo las bacterias que expresan la sHSP sobrevivieron en un 50 %. A lo largo del tratamiento esta diferencia se mantuvo en un rango similar, excepto en los cultivos tratados durante toda la noche. El resultado más sorprendente fue la gran viabilidad de las bacterias que expresan la proteína de estrés (71 %) en relación a las bacterias controles (24 %) después de toda la noche de tratamiento. Este resultado nos indica que quizás la proteína de

estrés puede desempeñar un papel importante durante el periodo de recuperación después del estrés.

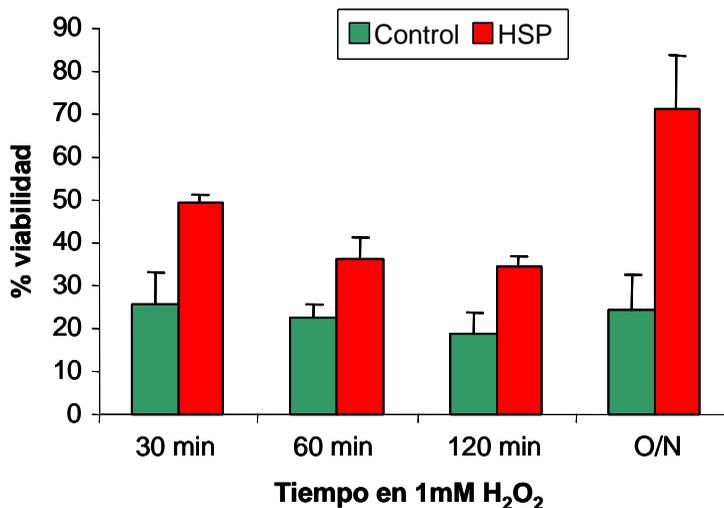


Figura IV.30. Efecto de la expresión de la sHSP de chirimoyo sobre la viabilidad de *E. coli* frente al estrés oxidativo. La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de unidades formadoras de colonias con respecto al número de unidades formadoras de colonias de un cultivo igual sin H₂O₂.

IV.5.4. Estrés salino.

El efecto protector de la proteína de estrés de chirimoyo frente al estrés salino se estudió cultivando las bacterias en medio LB con 5% de NaCl (0,85 M). Tres horas después de la inducción los cultivos se diluyeron hasta una D.O.₆₀₀ de 0,6 con LB y se añadió NaCl hasta una concentración final del 5%. Los cultivos se dejaron crecer a temperatura ambiente con agitación. En paralelo se realizó otro cultivo igual con NaCl al 0,5 %. A distintos tiempos después de la aplicación del tratamiento se cogieron alícuotas del cultivo y se determinó la viabilidad celular

Resultados

contando el número de colonias después de la incubación durante toda la noche a 37 °C.

Como se puede ver en la figura IV.31, el efecto protector de la sHSP frente al estrés salino es mucho menos pronunciado que frente a los demás tipos de estrés ensayados. La mayor protección se observó después de 1 hora de tratamiento. En este tiempo la viabilidad de las bacterias que expresan la proteína de estrés solo disminuyó en un 20 %, sin embargo, en las bacterias controles descendió al 50 %. Después de toda la noche creciendo en un 5% de NaCl, la supervivencia de ambos cultivos fue muy similar.

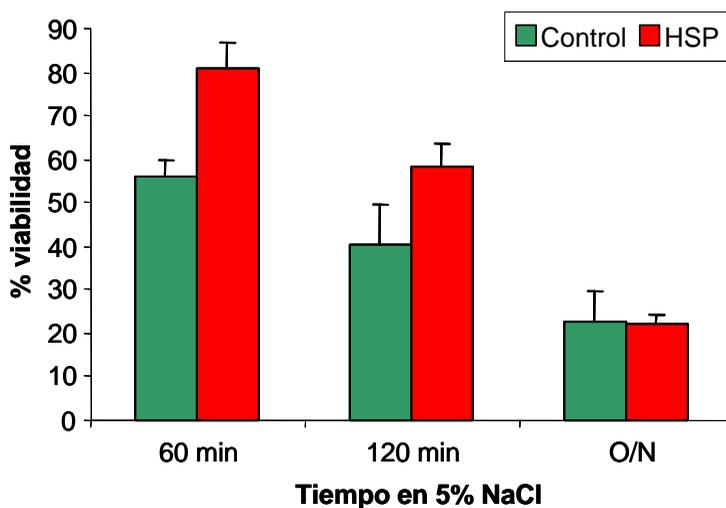


Figura IV.31. Efecto de la expresión de la sHSP de chirimoyo sobre la viabilidad de *E. coli* frente al estrés salino. La viabilidad celular se expresa como el porcentaje de unidades formadoras de colonias con respecto al número de unidades formadoras de colonias de un cultivo igual con NaCl al 0,5 %.

IV.6. Expresión en plantas.

Para estudiar el efecto protector de la proteína de estrés directamente en la planta procedimos a su expresión. Para ello, se utilizó el plásmido pGUSINT, en el que la expresión de la proteína está controlada por el promotor 35S de citomegalovirus.

Para realizar la construcción, se amplificó la secuencia completa de sHSP de chirimoya utilizando oligonucleótidos a los que se adicionó los sitios de restricción XbaI y KpnI (ver tabla III.2). La construcción en el vector pGUSINT se realizó sustituyendo el gen de la β -glucuronidasa (GUS) del vector por el gen de la proteína de estrés (Figura IV.32).

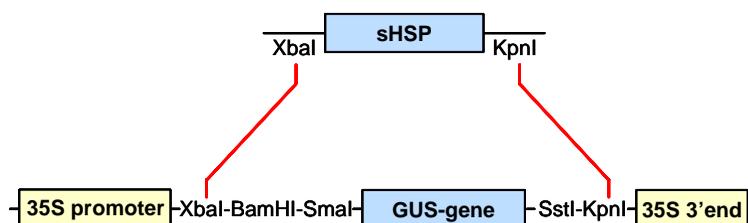


Figura IV.32. Sistema de expresión en plantas.

La construcción se transformó en la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* que se utilizará para la transformación en plantas de *Arabidopsis thaliana* y tabaco.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

I. Maduración de los frutos y daños por frío

El chirimoyo, especie subtropical que en Europa se cultiva casi exclusivamente en la franja costera de la provincia de Granada, produce frutos climatéricos que sufren una rápida maduración que los lleva a la senescencia en un breve periodo de tiempo, dificultando su comercialización, que se limita a mercados próximos a la zona de producción o a mercados a los que se acceda a través de canales comerciales muy ágiles.

Se han realizado numerosos ensayos para retrasar la senescencia de la chirimoya (Lahoz et al., 1990; De la Plaza 1979; Gutiérrez et al., 1992a) pero la mayoría de ellos han conducido a fracasos sucesivos por alterar gravemente las propiedades organolépticas de los frutos maduros o por impedir, por diversos mecanismos, la maduración post-cosecha. Únicamente se han obtenido éxitos en este campo utilizando la refrigeración (Lahoz et al. 1990; 1993; Gutiérrez et al. 1994a). Aún así, la senescencia se produce en un periodo de tiempo en torno a los 12 días, debido a que los frutos no se pueden refrigerar a muy bajas temperaturas por su aclimatación subtropical. Temperaturas de almacenamiento inferiores a 10-12 °C producen invariablemente la aparición de daños por frío (Gutiérrez et al. 1992b, 1994a, 1994b).

Las temperaturas mínimas de conservación son variables en función de la climatología en cada temporada y del periodo de recolección, que se extiende desde septiembre hasta mayo, con una parada en los meses fríos. Las chirimoyas recolectadas en épocas tempranas, mes de septiembre, son muy sensibles a las bajas temperaturas, mientras que aquellas recolectadas en épocas más frías son más resistentes (Lahoz et al. 1990). Este hecho es indicativo de que los frutos de

ambas épocas deben diferenciarse en alguna característica que explique la variable susceptibilidad a las bajas temperaturas.

La diferente susceptibilidad de los frutos a los daños por frío está influenciada por las condiciones ambientales antes de la recogida (Ferguson *et al.*, 1999), principalmente la temperatura durante el desarrollo del fruto. En distintos frutos se ha observado una disminución de los daños por frío al aplicar tratamientos con calor después de la recogida (Porat *et al.*, 2000; Saltveit, 2002; Sabehat *et al.*, 1998). Por analogía, la exposición a altas temperaturas en el árbol, sobre todo antes de la recogida, puede inducir tolerancia a las bajas temperaturas durante el almacenamiento (Ferguson *et al.*, 1999). Algunos frutos soportan mejor el almacenamiento a bajas temperaturas cuando, antes de la recogida, se exponen a bajas temperaturas pero siempre por encima de la temperatura que induce daños por frío. Estos resultados suponen una similitud entre los efectos de las altas y bajas temperaturas antes de la recogida en la tolerancia a las bajas temperaturas (Ferguson *et al.*, 1999).

El O₂ y CO₂ son moléculas biológicamente activas que tienen gran importancia en los procesos metabólicos de las plantas. Su influencia en el metabolismo, ha llevado a su uso para la modificación del comportamiento de las plantas con el objetivo de prolongar su almacenamiento (Beaudry, 1999). En el caso de frutos climatéricos, como la chirimoya, el O₂ y CO₂ probablemente actúan retrasando la maduración no solamente a través de su influencia en la respiración sino a través de su efecto inhibitorio de la acción del etileno (Beaudry, 1999).

La respuesta de los frutos y vegetales a modificaciones en la atmósfera de almacenamiento varía mucho entre distintas especies y variedades e incluye efectos beneficiosos y efectos perjudiciales. En muchos frutos, se ha demostrado

que el empleo de altas concentraciones de CO₂ y bajas concentraciones de O₂ reduce la aparición de daños por frío (Wang *et al.*, 1997; Porat *et al.*, 2004; Pesis *et al.*, 2000; Maldonado *et al.*, 2002; Nguyen *et al.*, 2004).

Se realizó un primer tratamiento en el que los frutos se almacenaron en atmósferas con porcentajes de CO₂ del 30 % al 100 % durante periodos cortos de tiempo. A continuación, se almacenaron durante 3 días a 8 °C y se dejaron madurar a 20 °C. El tratamiento con CO₂ produjo un retraso moderado en la senescencia y además produjo un efecto inhibitor del pardeamiento de los frutos, un proceso que afecta negativamente a la comercialización. El pardeamiento del fruto es producido por la actividad polifenol oxidasa (Martinez-Cayuela *et al.*, 1986), probablemente debido a la limitación en la disponibilidad de O₂ el tratamiento con CO₂ disminuye la actividad de este enzima.

Las concentraciones de CO₂ superiores al 30 % producen graves daños en los frutos, con aparición de lesiones necróticas (Figura X) originadas posiblemente por el déficit ocasionado en el metabolismo oxidativo sumado al daño originado por el almacenamiento a bajas temperaturas. En el experimento mostrado en la figura X, en el que los frutos se almacenaron a 8 °C, pudimos observar que en el 33 % de los frutos controles (8 frutos de un total de 24) aparecieron daños por frío. Sin embargo, si previo al almacenamiento a bajas temperaturas, los frutos eran tratados con un 30 % de CO₂ durante 18 horas no aparecían estas lesiones y los frutos maduraban con normalidad, aunque en algunos se apreciaban sabores extraños posiblemente debidos a fermentaciones indeseadas.

Con este primer tratamiento pudimos determinar la máxima concentración de CO₂ que produce un retraso en la maduración sin producir daños en los frutos.

Se aplicó un segundo tratamiento en el que los frutos se almacenaron a 8 °C en atmósferas con porcentajes de CO₂ del 10 % al 25 %, la concentración de O₂ fue siempre del 18 %. A continuación los frutos se dejaron madurar a temperatura ambiente.

Este tratamiento produjo una buena conservación de los frutos. En los frutos controles que fueron conservados durante 4 días a 8 °C se observó la aparición de daños por frío tanto en el pericarpio como en el mesocarpio de los frutos. El tratamiento con CO₂ evitó la aparición de estos daños y los frutos maduraron con normalidad.

La aparición de daños por frío durante la maduración de las chirimoyas se determina fácilmente midiendo dos parámetros sencillos como son el pH del mesocarpio y el contenido en sólidos solubles totales (Gutiérrez *et al*, 1994b). Las chirimoyas cuando son recolectadas tienen un alto contenido en almidón, que se puede observar al microscopio electrónico, y el pH del mesocarpio está por encima de 6. A lo largo de la maduración post-cosecha el almidón se va hidrolizando, dando lugar a la aparición de azúcares solubles, principalmente glucosa, fructosa y sacarosa (Gutiérrez *et al*, 1992b, 1994a; Sola *et al.*, 1994) responsables del endulzamiento del mesocarpio. Parte de la glucosa liberada es transformada en ácidos orgánicos, lo que produce una acentuada disminución del pH, que alcanza valores en torno a 4,5 cuando los frutos llegan al momento óptimo para su consumo. El incremento paulatino en la concentración de azúcares y de ácidos orgánicos determina una subida gradual en el índice de refracción, que en extractos de mesocarpio de chirimoya llega a valores que oscilan entre 20 y 24 °Brix, dependiendo de los frutos, variedades botánicas o cultivares y época de recolección.

La figura X muestra los valores de estos parámetros en frutos almacenados en distintas condiciones. La temperatura de 20 °C es la temperatura considerada control. Cuando los frutos se refrigeran a 8 °C se produce un retraso en la maduración como consecuencia de la refrigeración, pero los valores de pH y de SST son normales cuando se alcanza la senescencia. Ocurre lo mismo en frutos tratados con CO₂ pero este retraso es todavía más acentuado, al final del tratamiento también se alcanzaron valores adecuados de pH y SST.

Además también se determinó la evolución del contenido de glucosa y fructosa en el mesocarpio de los frutos a lo largo de la maduración (Figura X). En los frutos controles almacenados a 20 °C se produce un incremento en la concentración de estos azúcares aproximadamente en el cuarto día tras la recogida. Cuando los frutos se almacenaron a 8 °C, este incremento se retrasó aproximadamente dos días como consecuencia de la refrigeración pero al final de la maduración se alcanzaron los mismos valores que en frutos controles. En los frutos tratados con CO₂ también se alcanzaron valores normales de glucosa y fructosa al final del tratamiento.

Trabajos previos habían demostrado que la gravedad de los daños por frío en chirimoyas depende de la integridad de las membranas celulares que alteran el equilibrio osmótico (Gutiérrez, 1991). Frutos dañados por frío pueden alcanzar valores razonablemente elevados de sólidos solubles totales y sin embargo no llegar a acidificarse convenientemente. Este hecho se explica porque gran parte del metabolismo de azúcares no depende de orgánulos sino de la presencia de enzimas citosólicas, mientras que en los cambios de pH es determinante la integridad subcelular (Gutiérrez et al., 1992b; Sola et al., 1994).

II. Inducción de proteínas en mesocarpio de chirimoya por tratamientos con CO₂.

La proteómica es una técnica muy importante para entender los procesos celulares ya que nos permite relacionar los datos de expresión de genes con el metabolismo celular y el fenotipo de la planta (Zivy *et al.*, 2000). En los últimos años la proteómica está alcanzando un alto nivel gracias al desarrollo de potentes, fiables y repetitivos métodos de separación de proteínas e, igualmente importante, al desarrollo de métodos analíticos (Kersten *et al.*, 2002).

Para la identificación de proteínas inducidas en mesocarpio de chirimoya por el tratamiento con CO₂ hemos utilizado dos técnicas: electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2D-PAGE) para la separación y visualización de las proteínas y espectrometría de masas (MS) para la identificación de las proteínas separadas.

La electroforesis bidimensional, en la que las proteínas se separan en función de su punto isoelectrónico en la primera dimensión (isoelectroenfoque) y en función de su tamaño en la segunda, es una de las herramientas más poderosas para la separación de mezclas complejas de proteínas (Zivy *et al.*, 2000). La utilización de esta técnica para los extractos de chirimoya ha permitido la comparación de proteínas presentes en diferentes extractos. Aprovechando la alta concentración que pueden alcanzar las proteínas de estrés en los frutos, que pueden llegar al 1 % del total de proteínas (Waters *et al.*, 1996), no era necesaria la inmunodetección, sino que la comparación entre geles de frutos controles y de frutos tratados podía permitir deducir qué proteínas se inducen con los distintos tratamientos.

La figura X muestra geles de un fruto control y un fruto tratado con 30% de CO₂ en los que se ha utilizado un rango efectivo de pH para el isoelectroenfoque entre 5 y 8. Además de observar múltiples diferencias en la concentración relativa de muchas proteínas, el resultado más aparente fue la existencia de dos manchas muy notorias en los frutos tratados que no estaban en los controles y que fueron objeto de nuestro estudio posterior.

Para la identificación de estas proteínas se utilizó la técnica de MALDI-TOF que nos permite medir la masa de los péptidos resultantes después de la digestión de la proteína. Las masas obtenidas se comparan con los fragmentos peptídicos de otras proteínas incluidas en la base de datos. La obtención de resultados positivos con esta técnica depende de la información contenida en la base de datos. Esto es una limitación en el caso de la chirimoya ya que su genoma no ha sido secuenciado. En este caso, el objetivo de esta técnica es identificar las proteínas que presentan mayor homología con la proteína de interés (Perkins *et al.*, 1999).

Al analizar las proteínas inducidas por el tratamiento con CO₂ obtuvimos que presentaban homología con proteínas de estrés de bajo peso molecular (sHSP) de otras especies vegetales (Tabla X). Las HSPs son un tipo de proteínas sintetizadas por todos los organismos en respuesta a diferentes situaciones de estrés. La producción y acumulación de estas proteínas se ha relacionado con la tolerancia al estrés y con una menor incidencia de daños por frío (Sabehat *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 2002).

Se ha descrito que la acumulación de sHSPs es proporcional a la intensidad y a la duración del estrés (Waters *et al.*, 1996). La no aparición de estas bandas en frutos tratados con porcentajes de CO₂ superiores al 30 % no es

indicativo de que no sean proteínas de estrés, ya que como se ha discutido previamente la limitación excesiva en la disponibilidad de oxígeno resulta en efectos muy nocivos para los frutos. Sin embargo, el hecho de que aparezcan rápidamente durante el tratamiento y vayan desapareciendo a lo largo de la maduración está totalmente en concordancia con la vida media estimada para este tipo de proteínas (Chen *et al.*, 1990). Además los resultados obtenidos coinciden con los obtenidos en otros frutos en los que los niveles de sHSPs se mantienen elevados durante el periodo de conservación a bajas temperaturas pero descienden cuando los frutos se transfieren a temperatura ambiente (Sabehat *et al.*, 1998).

III. Identificación de genes de estrés.

El papel de las proteínas de estrés en plantas en relación con la resistencia al frío está siendo considerado cada vez más importante, por lo que decidimos estudiar la inducción de estas proteínas en chirimoya. Se han descrito seis clases diferentes de proteínas de estrés de bajo peso molecular (sHSPs) en plantas, todas ellas presentan una alta homología en el extremo carboxilo o dominio α -cristalino. Aprovechando esta alta homología pudimos diseñar oligonucleótidos que nos permitieron amplificar las sHSPs de chirimoya. Al analizar las secuencias de los productos de PCR encontramos cinco secuencias distintas de sHSPs de chirimoya que indican la existencia de una familia de genes de sHSPs de clase I. Todas las secuencias presentan un alto grado de homología entre ellas.

Otros autores ya habían descrito la existencia de familias de genes de sHSPs de clase I y de clase II en otras especies (Waters, 1995; Waters *et al.*, 1999; Schubert *et al.*, 2002), estos autores explican la alta homología entre las

sHSPs de la misma clase por fenómenos de conversión génica. Además Waters (1995) describe la existencia de genes parálogos en la familia de sHSPs de clase I.

Además también encontramos el uso de distintas señales de poliadenilación que puede ser un mecanismo regulador.

El extremo 5' de las sHSPs se determinó con 5'-RACE, con esta técnica pudimos determinar la región codificante casi completa de una sHSP de chirimoya. La falta de algunas bases del extremo 5' puede explicarse por la existencia de alguna estructura secundaria que impide la retrotranscripción de esta región. La secuencia obtenida presenta en el extremo amino la región consenso presente en todas las sHSPs de clase I y además presenta los dos motivos altamente conservados presentes en todas las sHSPs de plantas.

IV. Actividad de sHSP de chirimoya.

Entre las distintas clases de sHSPs, las sHSPs de clase I son las más abundantes en plantas (Scharf *et al.*, 2001; Schubert *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004) y pueden llegar a alcanzar el 1 % de las proteínas totales después del estrés, por este motivo, la mayoría de los trabajos sobre la estructura y función de las sHSPs de plantas se han hecho con sHSPs de esta clase.

La actividad chaperona de las sHSPs se ha demostrado mediante estudios *in vitro*, las sHSPs de distintas especies vegetales protegen a distintas proteínas modelo como la citrato sintasa (CS), malato deshidrogenasa (MDH), e insulina de la desnaturalización y agregación a altas temperaturas (Lee *et al.*, 1997; Collada *et al.*, 1997; Smýkal *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2004).

Debido a que las sHSPs de clase I pertenecen a una familia de genes, no hay disponibles mutantes *knock out* para sHSPs de clase I (Kim *et al.*, 2004), por este motivo, los estudios de su actividad *in vivo* se realizan mediante expresión heteróloga de la proteína. Para estudiar la actividad *in vivo* de la sHSP de clase I de chirimoya la hemos expresado en *Escherichia coli*, un organismo que no sintetiza sHSPs de clase I (Yeh *et al.*, 1997), fusionada a una cola de histidinas en el extremo amino.

La cola de histidinas no afecta a la función de las sHSPs ya que otros autores han descrito la actividad termoprotectora de sHSPs fusionadas a histidinas (Joe *et al.*, 2000) e incluso fusionadas a glutation transferasa (GST) (Yeh *et al.*, 1997; Smýkal *et al.*, 2000). La unión de GST al extremo amino bloqueó la oligomerización de la sHSP pero no su actividad chaperona (Smýkal *et al.*, 2000). Los dos aminoácidos que faltan en el extremo amino no son esenciales para la actividad chaperona, se ha descrito que la delección de los aminoácidos 1-29 del extremo amino de Oshsp16.9 (sHSP de clase I de arroz) no afecta a su actividad chaperona (Yeh *et al.*, 2002), lo mismo ocurre con la delección de 5 aminoácidos del extremo amino de HspF (Studer *et al.*, 2002).

Las chaperonas moleculares son proteínas que se unen a otras proteínas en estado no nativo. La sHSP de clase I de chirimoya permite que la mayoría de las proteínas de *Escherichia coli* permanezcan solubles hasta 80 °C (Figura X), Este resultado indica que esta sHSP puede interaccionar con muchas proteínas diferentes de *Escherichia coli* y protegerlas de la agregación producida por las altas temperaturas. Este amplio rango de sustrato de las sHSPs de clase I ya había sido descrito previamente (Joe *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2005). Esta protección de las proteínas frente a la agregación puede ser una explicación de la mayor viabilidad de las bacterias que sobreexpresan la proteína a 50 °C (figura X).

Además de las altas temperaturas la sHSP de chirimoya también protegió a *Escherichia coli* frente a las bajas temperaturas (Figura X). El mecanismo por el cual las sHSPs protegen frente a las bajas temperaturas no se conoce pero podría ser el mismo que para las altas temperaturas, la sHSP se puede unir a las proteínas parcialmente desnaturalizadas por el estrés manteniéndolas en una conformación activa. Esta función podría ser muy importante a bajas temperaturas ya que la solubilidad y las propiedades de plegamiento de muchas proteínas se encuentran alteradas (Guy *et al.*, 1998; Soto *et al.*, 1999). A diferencia del efecto termoprotector de las sHSPs, su efecto crioprotector ha sido poco estudiado, López-Matas *et al.*, (2004) demostraron el efecto crioprotector *in vitro* de CsHSP17.5 (sHSP de clase I de castaño), CsHSP17.5 protege a la lactato deshidrogenasa (LDH), un enzima sensible al frío, de la inactivación inducida por la congelación.

El estrés oxidativo, que frecuentemente acompaña a las altas temperaturas, al estrés salino y a la sequía, puede causar desnaturalización de proteínas funcionales y estructurales (Wang *et al.*, 2003; Vinocur *et al.*, 2005). Por esta razón, decidimos estudiar el efecto protector de las sHSPs de chirimoya frente al estrés oxidativo en *Escherichia coli*. En la figura X se muestra el porcentaje de supervivencia de las bacterias después de añadir H₂O₂ al medio de cultivo, después de media hora de tratamiento el crecimiento de las bacterias que expresan la proteína de estrés fue el doble que las bacterias controles. La mayor protección se consiguió después de toda la noche, las bacterias que expresan la proteína de estrés crecieron tres veces más que las bacterias controles, este resultado podría indicar que la proteína de estrés puede actuar durante el periodo de recuperación o que al unirse a las proteínas desnaturalizadas permite su renaturalización después del estrés, lo que permite la recuperación de las bacterias.

En plantas, las especies reactivas de oxígeno (ROS) se generan principalmente durante la fotosíntesis y el sitio principal de generación de ROS es el cloroplasto, se ha descrito que las sHSPs cloroplastídicas protegen del estrés oxidativo (Lee *et al.*, 2000), mediante la oxidación de las metioninas del consenso III pasando a sulfóxido de metionina. También se ha descrito el efecto protector frente al estrés oxidativo de sHSPs citosólicas de clase I (Jofré *et al.*, 2003). Las sHSPs de clase I carecen del dominio rico en metionina, esta protección la realizan actuando como chaperonas moleculares.

Otro tipo de estrés bastante común que puede afectar a las plantas es el estrés salino. Hamilton *et al.*, (2001) demostraron que las sHSPs mitocondriales protegen del estrés salino mediante un mecanismo antioxidante. Para estudiar el efecto de la sHSP de clase I de chirimoya en el estrés salino, aumentamos diez veces la concentración de NaCl en el medio de cultivo y estudiamos la supervivencia de las bacterias. El efecto protector frente al estrés salino fue mucho menor que frente a todos los demás tipos de estrés (Figura X), la mayor protección se consiguió dentro de la primera hora de estrés.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

- 1- Cuando los frutos de chirimoyo son almacenados en una atmósfera con un porcentaje de CO₂ entre 10 y 30 % se hacen más resistentes a los daños por frío causados por el almacenamiento a bajas temperaturas, disminuyéndose o anulándose la aparición de necrosis en el mesocarpio tras su maduración.
- 2- El tratamiento con CO₂ retrasó la maduración sin alterar ninguno de los valores de pH, SST, glucosa y fructosa que fueron similares a los valores obtenidos en frutos controles que fueron conservados a 20 °C en aire.
- 3- El almacenamiento de los frutos de chirimoyo durante 18 horas en una atmósfera con un 30 % de CO₂ induce la expresión de proteínas en el mesocarpio con características de proteínas de estrés. Del mismo modo, el almacenamiento de los frutos durante 24 horas a 4 °C induce la síntesis de proteínas con alta homología con sHSPs de otras especies vegetales.
- 4- Mediante técnicas de RT-PCR utilizando oligonucleótidos que hibridan en zonas conservadas de otras sHSPs descritas y la amplificación de los extremos con técnicas de RACE hemos obtenido una secuencia casi completa de una sHSP de chirimoyo, el alineamiento con otras sHSPs secuenciadas muestra que se trata de una sHSP de clase I.
- 5- La expresión heteróloga de la proteína de estrés de chirimoyo en *Escherichia coli* protege a las bacterias frente al estrés por altas y bajas temperaturas, el estrés oxidativo y el estrés salino. También protege de la desnaturalización térmica de las proteínas en disolución. Estos resultados demuestran la actividad chaperona *in vitro* e *in vivo* de la sHSP de chirimoya.

VII REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Sahi C, Gallie DR, Grover A. (2001)** *Arabidopsis thaliana* Hsp100 proteins: kith and kin. *Cell Stress and Chaperones* 6: 219-224.
- Agarwal M, Katiyar-Agarwal S, Grover A. (2002)** Plant HSP 100 proteins: structure, function and regulation. *Plant Science* 163: 397-405.
- Alique R, Zamorano JP. (2000)** Influence of harvest date within the season and cold storage on cherimoya fruit ripening. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 4209-4216.
- Almoguera C, Jordano J. (1995)** Developmental and environmental concurrent expression of sunflower dry-seed-stored low-molecular-weight heat-shock protein and Lea mRNAs. *Plant Molecular Biology* 29: 1093-1099.
- Almoguera C, Coca MA, Jordano J. (1993)** Tissue-specific expression of sunflower heat shock proteins in response to water stress. *The Plant Journal* 4: 947-958.
- Almoguera C, Prieto-Dapena P, Jordano J. (1998)** Dual regulation of a heat shock promoter during embryogenesis: stage-dependent role of heat shock elements. *The Plant Journal* 13: 437-446.
- Almoguera C, Rojas A, Díaz-Martín J, Prieto-Dapena P, Carranco R, Jordano J. (2002)** A seed-specific heat-shock transcription factor involved in developmental regulation during embryogenesis in sunflower. *Journal of Biological Chemistry* 277: 43866-43872.

Referencias bibliográficas

- Amin J, Ananthan J, Voellmy R. (1988)** Key features of heat shock regulatory elements. *Molecular and Cellular Biology* 8: 3761-3769.
- An JF, Paull RE. (1990)** Storage temperature and ethylene influence on ripening of papaya fruit. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 115: 949-953.
- Aparicio F, Thomas CL, Lederer C, Niu Y, Wang D, Maule AJ. (2005)** Virus Induction of Heat Shock Protein 70 Reflects a General Response to Protein Accumulation in the Plant Cytosol. *Plant Physiology* 138: 529–536.
- Artés F, Artés-Hernández F. (2003)** Daños por frío en la postrecolección de frutas y hortalizas. *Avances en Ciencias y Técnicas del Frío-1*. Edit: UPCT y SECYTEF: 299-310.
- Atkinson BG, Raizada M, Bouchard RA, Frappier JRH, Walden DB. (1993)** The independent stage-specific expression of the 18 kDa heat shock protein genes during microsporogenesis in *Zea mays* L. *Developmental Genetics* 14: 15-26.
- Baniwal SK, Bharti K, Chan KY, Fauth M, Ganguli A, Kotak S, Mishra SK, Nover L, Port M, Scharf KD, Tripp J, Weber C, Zielinski D, von Koskull-Doring P. (2004)** Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *Journal of Bioscience* 29: 471-87.
- Banzet N, Richaud C, Deveaux Y, Kazmaier M, Gagnon J, Triantaphylidès, C. (1998)** Accumulation of small heat shock proteins, including

mitochondrial HSP22, induced by oxidative stress and adaptive response in tomato cells. *The Plant Journal* 13: 519-527.

Barros MD, Czarnecka E, Gurley WB. (1992) Mutational analysis of a plant heat shock element. *Plant Molecular Biology* 19: 665-675.

Basha EM, Waters ER, Vierling E. (1999) *Triticum aestivum* cDNAs homologous to nuclear-encoded mitochondrion-localized small heat shock proteins. *Plant Science* 141: 93-103.

Basha E, Friedrich KL, Vierling E. (2006) The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity. *The Journal of Biological Chemistry* 281: 39943–39952.

Batu A. (2003) Temperature effects on fruit quality of mature green tomatoes during controlled atmosphere storage. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 54: 201-208.

Beaudry RM. (1999) Effect of O₂ and CO₂ partial pressure on selected phenomena affecting fruit and vegetable quality. *Postharvest Biology and Technology* 15: 293–303.

Bergmeyer HU, Bernt E, Schmidt F, Stark H. (1974) Determination with hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. (Bergmeyer HU ed.): 1197-1201. Velay Chemie Academic Press Inc. New York and London.

Referencias bibliográficas

- Bernt E, Bergmeyer HU. (1974)** Fructose. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. (Bergmeyer HU ed.): 1304-1307. Velay Chemie Academic Press Inc. New York and London.
- Bienz M, Pelham HRB. (1987)** Mechanism of heat-shock gene activation in higher eukaryotes. *Advances in Genetic* 24: 31-72.
- Bouchard RA. (1990)** Characterization of expressed meiotic prophase repeat transcript clones of *Lilium*: meiosis-specific expression, relatedness, and affinities to small heat shock proteins genes. *Genome* 33: 68-79.
- Bradford M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analysis of Biochemistry* 72: 248-254.
- Bukau B, Horwich AL. (1998)** The Hsp70 and Hsp60 Chaperone Machines. *Cell* 92: 351–366.
- Burdon J, Lallu N, Francis K, Bolding H. (2007)** The susceptibility of kiwifruit to low temperature breakdown is associated with pre-harvest temperatures and at-harvest soluble solids content. *Postharvest Biology and Technology* 43: 283–290.
- Cai C, Xu C, Shan L, Li X, Zhou C, Zhang W, Ferguson I, Chen K. (2006)** Low temperature conditioning reduces postharvest chilling injury in loquat fruit. *Postharvest Biology and Technology* 41: 252–259.
- Campbell JL, Klueva NY, Zheng HG, Nieto-Sotelo J, Ho THD, Nguyen HT. (2001)** Cloning of new members of heat shock protein HSP101 gene

family in wheat (*Triticum aestivum* (L.) Monech) inducible by heat, dehydration, and ABA. *Biochemical and Biophysical Acta* 1517: 270-277.

Carranco R, Almoguera C, Jordano J. (1997) A plant small heat shock protein gene expressed during zygotic embryogenesis but noninducible by heat stress. *Journal of Biological Chemistry* 272: 27470-27475.

Carranco R, Almoguera C, Jordano J. (1999) An imperfect heat shock element and different upstream sequences are required for the seed-specific expression of a small heat shock protein gene. *Plant Physiology* 121: 723-730.

Chen Q, Lauzon LM, DeRocher AE, Vierling E. (1990) Accumulation, stability, and localization of a mayor chloroplast heat-shock protein. *Journal of Cell Biology* 110: 1873-1883.

Chen Q, Vierling E. (1991) Analysis of conserved domains identifies a unique structural feature of a chloroplast heat shock protein. *Molecular and General Genetics* 226: 425-431.

Cho EK, Hong CB. (2006) Over-expression of tobacco NtHSP70-1 contributes to drought-stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports* 25: 349-358.

Clos J, Westwood JT, Becker PB, Wilson S, Lambert U, Wu C. (1990) Molecular cloning and expression of a hexameric *Drosophila* heat stress factor subject to negative regulation. *Cell* 63: 1085-1097.

Coca MA, Almoguera C, Jordano J. (1994) Expression of sunflower low-molecular-weight heat shock proteins during embryogenesis and

Referencias bibliográficas

persistence after germination: localization and possible functional implications. *Plant Molecular Biology* 25: 479-492.

Coca MA, Almoguera C, Thomas TL, Jordano J. (1996) Differential regulation of small heat-shock genes in plants: analysis of a water-stress-inducible and developmentally activated sunflower promoter. *Plant Molecular Biology* 31: 863-876.

Collada C, Gómez L, Casado R, Aragoncillo C. (1997) Purification and *in vitro* chaperone activity of a class I small heat-shock protein abundant in recalcitrant chestnut seeds. *Plant Physiology* 115: 71-77.

Conner TW, LaFayette PR, Nagao RT, Key JL. (1990) Sequence and expression of a HSP83 from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 94: 1689-1695.

Czarnecka E, Gurley WB, Nagao RT, Mosquera LA, Key JL. (1985) DNA sequence and transcript mapping of a soybean gene encoding a small heat shock protein. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 82: 3726-3730.

Czarnecka E, Nagao RT, Key JL, Gurley WB. (1988) Characterization of Gmhsp26-A, a stress gene encoding a divergent heat shock protein of soybean: heavy-metal-induced inhibition of intron processing. *Molecular Cellular Biology* 8: 1113-1122.

Czarnecka-Verner E, Key JL, Gurley WB. (1989) Regulatory domains of the Gmhsp17.5-E heat shock promoter of soybean: a mutational analysis. *Molecular and Cellular Biology* 9: 3457-3463.

- Czarnecka-Verner E, Yuan CX, Nover L, Scharf KD, English G, Gurley WB. (1998)** Plant heat shock transcription factors: positive and negative aspects of regulation. *Acta Physiology Plant* 19: 523-537.
- Czarnecka-Verner E, Yuan CX, Scharf KD, English G, Gurley WB. (2000)** Plants contain a novel multi-member class of heat shock factors without transcriptional activator potential. *Plant Molecular Biology* 43: 459–471.
- Czarnecka-Verner E, Pan S, Salem T, Gurley WB. (2004)** Plant class B HSFs inhibit transcription and exhibit affinity for TFIIB and TBP. *Plant Molecular Biology* 56: 57–75.
- de la Plaza JL. (1979)** Controlled atmosphere storage of cherimoya. *XVth International Congress of Refrigeration (Venice 1979) Proceedings Vol. III*. pp. 701-712.
- DeRocher AE, Vierling E. (1994)** Developmental control of small heat shock protein expression during pea seed maturation. *The Plant Journal* 5: 93-102.
- DeRocher AE, Helm KW, Lauzon LM, Vierling E. (1991)** Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular weight heat shock proteins during heat stress and recovery. *Plant Physiology* 96: 1038-1047.
- Díaz-Martín J, Almoguera C, Prieto-Dapena P, Espinosa JM, Jordano J. (2005)** Functional interaction between two transcription factors involved in the developmental regulation of a small heat stress protein gene promoter. *Plant Physiology* 139: 1483–1494.

- Dietrich PS, Bouchard RA, Casey ES, Sinibaldi RM. (1991)** Isolation and characterization of a small heat shock protein gene from maize. *Plant Physiology* 96: 1268-1276.
- Ding CK, Wang CY, Gross KC, Smith DL. (2001)** Reduction of chilling injury and transcript accumulation of heat shock proteins in tomato fruit by methyl jasmonate and methyl salicylate. *Plant Science* 161: 1153–1159.
- Ding XZ, Tsokos GC, Kiang1 JG. (1998)** Overexpression of HSP-70 inhibits the phosphorylation of HSF1 by activating protein phosphatase and inhibiting protein kinase C activity. *FASEB Journal* 12: 451–459.
- Döring P, Treuter E, Kistner C, Lyck R, Chen A, Nover L. (2000)** The role of AHA motifs in the activator function of tomato heat stress transcription factors HsfA1 and HsfA2. *The Plant Cell* 12: 265–278.
- Downs CA, Heckathorn SA. (1998)** The mitochondrial small heat-shock protein protects NADH: ubiquinone oxidoreductase of the electron transport chain during heat stress in plants. *FEBS Letters* 430: 246-250.
- Downs CA, Jones LR, Heckathorn SA. (1999)** Evidence for a novel set of small heat-shock proteins that associates with the mitochondria of murine PC12 cells and protects NADH:ubiquinone oxidoreductase from heat and oxidative stress. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 365: 344-350.
- Eckey-Kaltenbach H, Kiefer E, Grosskopf E, Ernst D, Sandermann H. (1997)** Differential transcript induction of parsley pathogenesis-related proteins and of a small heat shock protein by ozone and heat shock. *Plant Molecular Biology* 33: 343-350.

- Ehrnsperger M, Gräber S, Gaestel M, Buchner J. (1997)** Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *The EMBO Journal* 16: 221–229.
- Felsheim RF, Das A. (1992)** Structure and expression of a heat-shock protein 83 gene of *Pharbitis nil*. *Plant Physiology* 100: 1764–1771.
- Felts SJ, Owen BAL, Nguyen PM, Trepel J, Donner DB, Toft DO. (2000)** The Hsp90-related protein TRAP1 is a mitochondrial protein with distinct functional properties. *Journal of Biological Chemistry* 275: 3305–3312.
- Ferguson I, Volz R, Woolf A. (1999)** Preharvest factors affecting physiological disorders of fruit. *Postharvest Biology and Technology* 15: 255–262.
- Forreiter C, Kirschner M, Nover L. (1997)** Stable transformation of an Arabidopsis cell suspension culture with firefly luciferase providing a cellular system for analysis of chaperone activity in vivo. *Plant Cell* 9: 2171-2181.
- Fray RG, Lycett GW, Grierson D. (1990)** Nucleotide sequence of a heat shock and ripening related cDNA from tomato. *Nucleic Acids Research* 18: 7148.
- Fu X, Chang Z. (2006)** Identification of a highly conserved Pro-Gly doublet in non-animal small heat shock proteins and characterization of its structural and functional roles in *Mycobacterium tuberculosis* Hsp16.3. *Biochemistry* 71: S83-S90.
- Fu X, Liu C, Liu Y, Feng X, Gu L, Chen X, Chang Z. (2003)** Small heat shock protein Hsp16.3 modulates its chaperone activity by adjusting the rate of

oligomeric dissociation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 310: 412–420.

Gallie DR, Fortner D, Peng J, Puthoff D. (2002) ATP-dependent hexameric assembly of the heat shock protein hsp101 involves multiple interaction domains and a functional C-proximal nucleotide-binding domain. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 39617–39626.

Giese KC, Vierling E. (2002) Changes in oligomerization are essential for the chaperone activity of a small heat shock protein *in vivo* and *in vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 46310–46318.

Gong M, Chen B, Li ZG, Guo LH. (2001) Heat-shock-induced cross adaptation to heat, chilling, drought and salt stress in maize seedlings and involvement of H₂O₂. *Journal of Plant Physiology* 158: 1125–1130.

Gottesman S, Squires C, Pichersky E, Carrington M, Hobbs M, Mattick JS, Dalrymple B, Kuramitsu H, Shiroza T, Foster T, Clark WP, Ross B, Squires CL, Maurizi MR. (1990) Conservation of the regulatory subunit for the Clp ATP-dependent protease in prokaryotes and eukaryotes. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 87: 3513–3517.

Gulli M, Rampino P, Lupotto E, Marmiroli N, Perrotta C. (2005) The effect of heat stress and cadmium ions on the expression of a small hsp gene in barley and maize. *Journal of Cereal Science* 42: 25–31.

Gusev NB, Bogatcheva NV, Marston SB. (2002) Structure and properties of small heat shock proteins (sHsp) and their interaction with cytoskeleton proteins. *Biochemistry (Moscow)* 67: 511-519.

Gutiérrez M. (1991) Estudio bioquímico y morfológico de la maduración de los frutos del chirimoyo conservados a bajas temperaturas. Tesis doctoral.

Gutiérrez M, Pascual L, Sola MM, Rodríguez-García MI, Vargas AM. (1992a) SEM studies of cherimoya fruits during ripening. *Electron Microscopy 3*: EUREM 92.

Gutiérrez M, Sola MM, Pascual L, Rodríguez-García MI, Vargas AM. (1992b) Ultrastructural changes in cherimoya fruit injured by chilling. *Food Structure 11*: 323-332

Gutiérrez M, Sola MM, Pascual L, Vargas AM. (1994a) Postharvest changes of sugar concentrations in chilled-injured cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). *Journal of Plant Physiology 143*: 27-32.

Gutiérrez M, Lahoz JM, Sola MM, Pascual L, Vargas AM. (1994b) Postharvest changes in total soluble solids and tissue pH of cherimoya fruit stored at chilling and non-chilling temperatures. *Journal of Horticultural Science 69*: 459-463.

Guy CL, Li QB. (1998) The Organization and Evolution of the Spinach Stress 70 Molecular Chaperone Gene Family. *The Plant Cell 10*: 539–556.

Guy C, Haskell D, Li QB. (1998) Association of proteins with the stress 70 molecular chaperones at low temperature: evidence for the existence of cold labile proteins in spinach. *Cryobiology 36*: 301–314.

- Györgyey J, Gartner A, Németh K, Magyar Z, Hirt H, Heberle-Bors E, Dudits D. (1991)** Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. *Plant Molecular Biology* 16: 999-1007.
- Hall JL. (2002)** Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *Journal of Experimental Botany* 53: 1-11.
- Hamilton EW, Heckathorn SA. (2001)** Mitochondrial adaptations to NaCl. Complex I is protected by anti-oxidants and small heat shock proteins, whereas complex II is protected by proline and betaine. *Plant Physiology* 126: 1266-1274.
- Härndahl U, Hall RB, Osteryoung KW, Vierling E, Bornman JF, Sundby C. (1999)** The chloroplast small heat shock protein undergoes oxidation-dependent conformational changes and may protect plants from oxidative stress. *Cell Stress & Chaperones* 4: 129–138.
- Härndahl U, Kokke BP, Gustavsson N, Linse S, Berggren K, Tjerneld F, Boelens WC, Sundby C. (2001)** The chaperone-like activity of a small heat shock protein is lost after sulfoxidation of conserved methionines in a surface-exposed amphipathic alpha-helix. *Biochimica et Biophysica Acta* 1545: 227-237.
- Hartl, F.U. (1996)** Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571–580.
- Haslbeck M. (2002)** sHsps and their role in the chaperone network. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59: 1649–1657.

- Haslbeck M, Ignatiou A, Saibil H, Helmich S, Frenzl E, Stromer T, Buchner J. (2004)** A domain in the N-terminal part of hsp26 is essential for chaperone function and oligomerization. *Journal of Molecular Biology* 343: 445–455.
- Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurtner D, Buchner J. (2005)** Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nature Structural & Molecular Biology* 12: 842-846.
- Heckathorn SA, Downs CA, Sharkey JS, Coleman JS. (1998)** The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress. *Plant Physiology* 116: 439-444.
- Heckathorn SA, Mueller JK, Laguidice S, Zhu B, Barrett T, Blair B, Dong Y. (2004)** Chloroplast small heat-shock proteins protect photosynthesis during heavy metal stress. *American Journal of Botany* 91: 1312–1318.
- Helm KW, LaFayette PR, Nagao RT, Key JL, Vierling E. (1993)** Localization of small heat shock proteins to the higher plant endomembrane system. *Molecular and Cellular Biology* 13: 238-247.
- Helm KW, Lee GJ, Vierling E. (1997)** Expression and native structure of Cytosolic Class II Small Heat-Shock Proteins. *Plant Physiology* 114: 1477-1485.
- Hendrick JP, Hart FU. (1995)** The role of molecular chaperones in protein folding. *FASEB Journal* 9: 1559-1569.

Referencias bibliográficas

- Hernandez LD, Vierling E. (1993)** Expression of low molecular weight heat shock proteins under field conditions. *Plant Physiology* 101: 1209-1216.
- Hill JE, Hemmingsen SM. (2001)** *Arabidopsis thaliana* type I and II chaperonins. *Cell Stress & Chaperones* 6: 190–200.
- Hopf N, Plesofsky-Vig N, Brambl R. (1992)** The heat shock response of pollen and other tissues of maize. *Plant Molecular Biology* 19: 623-630.
- Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT. (1985)** A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1229-1231.
- Hsieh MH, Chen JT, Jinn TL, Chen YM, Lin CY. (1992)** A class of soybean low molecular weight heat shock proteins, immunological study and quantitation. *Plant Physiology* 99: 1279-1284.
- Jinn TL, Chen YM, Lin CY. (1995)** Characterization and physiological function of class I low-molecular-mass, heat-shock protein complex in soybean. *Plant Physiology* 108: 693-701.
- Joe MK, Park SM, Lee YS, Hwang DS, Hong CB. (2000)** High temperature stress resistance of *Escherichia coli* induced by a tobacco class I low molecular weight heat-shock protein. *Molecules and Cells* 10: 519-524.
- Jofré A, Molinas M, Pla M. (2003)** A 10-kDa class-CI sHsp protects *E. coli* from oxidative and high-temperature stress. *Planta* 217: 813–819.
- Kadyrzhanova DK, Vlachonasios KE, Ververidis P, Dilley DR. (1998)** Molecular cloning of a novel heat induced/chilling tolerance related cDNA

in tomato fruit by use of mRNA differential display. *Plant Molecular Biology* 36: 885-895.

Katiyar-Agarwal S, Agarwal M, Gallie DR, Grover A. (2001) Search for the cellular functions of plant Hsp100/Clp family proteins. *Critical Reviews in Plant Sciences* 20: 277-295.

Katiyar-Agarwal S, Agarwal M, Grover A. (2003) Heat-tolerant basmati rice engineered by over-expression of hsp101. *Plant Molecular Biology* 51: 677-686.

Katschinski DM. (2004) On Heat and Cells and Proteins. *News Physiology Science* 19: 11-15.

Keeler SJ, Boettger CM, Haynes JG, Kuches KA, Johnson MM, Thureen DL, Keeler CL Jr, Kitto SL. (2000) Acquired thermo tolerance and expression of the HSP100/ClpB genes of lima bean. *Plant Physiology* 123: 1121-1132.

Kersten B, Bürkle L, Kuhn EJ, Giavalisco P, Konthur Z, Lueking A, Walter G, Eickhoff H, Schneider U. (2002) Large-scale plant proteomics. *Plant Molecular Biology* 48: 133-141.

Kim BH, Schoffl F. (2002) Interaction between Arabidopsis heat shock transcription factor 1 and 70 kDa heat shock proteins. *Journal of Experimental Botany* 53: 371-375.

- Kim KP, Joe MK, Hong CB. (2004)** Tobacco small heat-shock protein, NtHSP18.2, has broad substrate range as a molecular chaperone. *Plant Science* 167: 1017–1025.
- Klein JD. (1989)** Ethylene biosynthesis in heat treated apples. En: *Biochemical and physiological aspects of ethylene production in lower and higher plants*, págs.: 181-189. Eds.: H. Clijters. Kluwer Press, Dordrecht.
- Klein JD, Lurie S, Ben-Arie R. (1990)** Quality and cell wall components of ‘Anna’ and ‘Granny Smith’ apples treated with heat, calcium, and ethylene. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 115: 954-958.
- Kobayashi T, Kobayashi E, Sato S, Hotta Y, Miyajima N, Tanaka A, Tabata S. (1994)** Characterization of cDNAs induced in meiotic prophase in lily microsporocytes. *DNA Research* 1: 15-26.
- Koning, AJ, Rose R, Comai L. (1992)** Developmental expression of tomato heat-shock cognate protein 80. *Plant Physiology* 100: 801–811.
- Kratsch HA, Wise RR. (2000)** The ultrastructure of chilling stress. *Plant, Cell and Environment* 23: 337-350.
- Krishna P, Gloor G. (2001)** The Hsp90 family of proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress & Chaperones* 6: 238–246.
- Krishna P, Sacco M, Cherutti JF, Hill S. (1995)** Cold-induced accumulation of Hsp90 transcripts in *Brassica napus*. *Plant Physiology* 107: 915–923.

- Kruse E, Liu Z, Kloppstech K. (1993)** Expression of heat shock protein during developmental of barley. *Plant Molecular Biology* 23: 111-122.
- LaFayette PR, Nagao RT, O'Grady K, Vierling E, Key JL. (1996)** Molecular characterization of cDNAs encoding low-molecular-weight heat shock proteins of soybean. *Plant Molecular Biology* 30: 159-169.
- Lahoz J, Gutiérrez M, Martínez-Cayuela M, Pascual L, Vargas AM. (1990)** Efecto de la refrigeración sobre la maduración del fruto del chirimoyo. *Ars Pharmaceutica* 31: 211-216.
- Lahoz J, Gutiérrez M, Sola MM, Salto R, Pascual L, Martínez-Cayuela M, Vargas AM. (1993)** Ethylene in cherimoya fruit (*Annona cherimola* Mill.) under different storage conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41: 721-723.
- Larkindale J, Knight MR. (2002)** Protection against heat stress-induced oxidative damage in Arabidopsis involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid. *Plant Physiology* 128: 682-695.
- Lawrence SD, Cline K, Moore GA. (1997)** Chromoplast development in ripening tomato fruit: identification of cDNAs for chromoplast-targeted proteins and characterization of a cDNA encoding a plastid-localized low-molecular-weight heat shock protein. *Plant Molecular Biology* 33: 483-492.
- Lee BH, Won SH, Lee HS, Miyao M, Chung WI, Kim IJ, Jo J. (2000)** Expression of the chloroplast-localized small heat shock proteins by oxidative stress in rice. *Gene* 245: 283-290.

Referencias bibliográficas

- Lee GJ, Vierling E. (2000)** A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiology* 122: 189-197.
- Lee GJ, Pokala N, Vierling E. (1995)** Structure and *in vitro* molecular chaperone activity of cytosolic small heat shock proteins from pea. *The Journal of Biological Chemistry* 270: 10432-10438.
- Lee GJ, Roseman AM, Saibil HR, Vierling E. (1997)** A small heat shock protein stably binds heat-denatured model substrates and can maintain a substrate in a folding-competent state. *The EMBO Journal* 16: 659-671.
- Lee JH, Schoffl F. (1996)** An Hsp70 antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF, and the acquisition of thermotolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Genetics and Genomics* 252: 11-19.
- Lee YJ, Nagao RT, Key JL. (1994)** A soybean 101-kDa heat shock protein complements yeast HSP 104 deletion mutant in acquiring thermotolerance. *Plant Cell* 6: 1889-1897.
- Lenne C, Douce R. (1994)** A low molecular mass heat-shock protein is localized to higher plant mitochondria. *Plant Physiology* 105: 1255-1261.
- Lenne C, Block, MA, Garin J, Douce R. (1995)** Sequence and expression of the mRNA encoding HSP22, the mitochondrial small heat-shock protein in pea leaves. *Biochemical Journal* 311: 805-813.

- Levy-Rimler G, Bell RE, Ben-Tal N, Azem A. (2002)** Type I chaperonins: not all are created equal. *FEBS Letters* 529: 1-5.
- Lin BL, Wang JS, Liu HC, Chen RW, Meyer Y, Barakat A, Delseny M. (2001)** Genomic analysis of the Hsp70 superfamily in *Arabidopsis thaliana*. *Cell Stress & Chaperones* 6: 201–208.
- Lohmann C, Eggers-Schumacher G, Wunderlich M, Schöffl F. (2004)** Two different heat shock transcription factors regulate immediate early expression of stress genes in *Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics* 271: 11–21.
- López-Matas MA, Nuñez P, Soto A, Allona I, Casado R, Collada C, Guevara MA, Aragoncillo C, Gomez L. (2004)** Protein cryoprotective activity of a cytosolic small heat shock protein that accumulates constitutively in chestnut stems and is up-regulated by low and high temperatures. *Plant Physiology* 134: 1708-1717.
- Löw D, Brändle K, Nover L, Forreiter C. (2000)** Cytosolic heat-stress proteins Hsp17.7 class I and Hsp 17.3 class II of tomato act as molecular chaperones *in vivo*. *Planta* 211: 575-582.
- Lubaretz O, zur Nieden U. (2002)** Accumulation of plant small heat-stress proteins in storage organs. *Planta* 215: 220–228.
- Lund, AA, Rhoads DM, Lund AL, Cerny RL, Elthon TE. (2001)** *In vivo* modifications of the maize mitochondrial small heat stress protein, HSP22. *Journal of Biological Chemistry* 276: 29924-29929.

- Lurie S. (1998)** Postharvest heat treatments. *Postharvest Biology and Technology* 14: 257–269.
- Ma C, Haslbeck M, Babujee L, Jahn O, Reumann S. (2006)** Identification and characterization of a stress-inducible and a constitutive small heat shock protein targeted to the matrix of plant peroxisomes. *Plant Physiology* 141: 47–60.
- MacRae TH. (2000)** Structure and function of small heat shock: α -crystallin proteins: established concepts and emerging ideas. *Cellular and Molecular Life Science* 57: 899–913.
- Maldonado R, Molina-García AD, Sánchez-Ballesta MT, Escribano MI, Merodio C. (2002)** High CO₂ atmosphere modulating the phenolic response associated with cell adhesion and hardening of *Annona cherimola* fruit stored at chilling temperature. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 7564-7569.
- Maldonado R, Sánchez-Ballesta MT, Alique R, Escribano MI, Merodio C. (2004)** Malate metabolism and adaptation to chilling temperature storage by pretreatment with high CO₂ levels in *Annona cherimola* fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 4758-4763.
- Marrs KA, Casey ES, Capitant SA, Bouchard RA, Dietrich PS, Mettler IJ, Sinibaldi RM. (1993)** Characterization of two maize HSP90 heat shock protein genes: expression during heat shock, embryogenesis and pollen development. *Developmental Genetics* 14: 27–41.

- Martínez-Cayuela M, Plata MC, Sánchez de Medina L, Gil A, Faus MJ. (1986)** Evolución de diversas actividades enzimáticas durante la maduración del chirimoyo en atmósfera controlada. *Ars Pharmaceutica* 27: 371-380.
- Mayer MP, Bukau B. (2005)** Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and Molecular Life Sciences*: 62: 670–684.
- Medina-Escobar N, Cárdenas J, Muñoz-Blanco J, Caballero JL. (1998)** Cloning and molecular characterization of a strawberry fruit ripening-related cDNA corresponding a mRNA for a low-molecular-weight heat-shock protein. *Plant Molecular Biology* 36: 33-42.
- Miernyk, JA. (1997)** The 70kDa stress-related proteins as molecular chaperones. *Trends in Plant Science* 2: 180–187.
- Miernyk JA. (1999)** Protein folding in the plant cell. *Plant Physiology* 121: 695-703.
- Moore T, Keegstra K. (1993)** Characterization of a cDNA clone encoding a chloroplast-targeted Clp homologue. *Plant Molecular Biology* 21: 525-537.
- Morimoto RI. (1998)** Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators. *Genes & Development* 12: 3788–3796.
- Morrow G, Inaguma Y, Kato K, Tanguay RM. (2000)** The small heat shock protein Hsp22 of *Drosophila melanogaster* is a mitochondrial protein

Referencias bibliográficas

displaying oligomeric organization. *Journal of Biological Chemistry* 275: 31204–31210.

Munchbach M, Nocker A, Narberhaus F. (1999) Multiple small heat shock proteins in Rhizobia. *Journal of Bacteriology* 181: 83–90.

Nakai A. (1999) New aspects in the vertebrate heat stress factor system: HsfA3 and HsfA4. *Cell Stress Chaperones* 4: 86-93.

Neta-Sharir I, Isaacson T, Lurie S, Weiss D. (2005) Dual role for tomato heat shock protein 21: protecting photosystem II from oxidative stress and promoting color changes during fruit maturation. *The Plant Cell* 17: 1829–1838.

Nguyen TBT, Ketsa S, van Doorn WG. (2004) Effect of modified atmosphere packaging on chilling-induced peel browning in banana. *Postharvest Biology and Technology* 31: 313–317.

Nieto-Sotelo J, Kannan K.B., Segal M.C. (1999) Characterization of a maize heat-shock protein 101 gene, HSP101, encoding a ClpB/Hsp100 protein homologue. *Gene* 230: 187-195.

Nishimura A, Morita M, Nishimura Y, Sugino Y. (1990) A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. *Nucleic Acids Research* 18: 6169.

Nover L. (1991) Heat shock response. Boca Raton, FL: CRC Press.

Nover L, Scharf KD. (1997) Heat stress proteins and transcription factors. *Molecular and Cellular Life Science* 53: 80-103.

- Nover L, Scharf KD, Neumann D. (1989)** Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Molecular and Cellular Biology* 9: 1298-1308.
- Nover L, Scharf KD, Gagliardi D, Vergne P, Czarnecka-Verner E, Gurley WB. (1996)** The Hsf world: classification and properties of plant heat stress transcription factors. *Cell Stress Chaperones* 1: 215-223.
- Nover L, Bharti K, Döring P, Mishra SK, Ganguli A, Scharf KD. (2001)** *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need?. *Cell Stress & Chaperones* 6: 177-189.
- Owens-Grillo JK, Stancato LF, Hoffmann K, Pratt WB, Krishna P. (1996)** Binding of immunophilins to the 90 kDa heat shock protein (Hsp90) via a tetratricopeptide repeat domain is a conserved protein interaction in plants. *Biochemistry* 35: 15249–15255.
- Palma T, Aguilera JM, Stanley DW. (1993)** A review of postharvest events in cherimoya. *Postharvest Biology and Technology* 2: 187-208.
- Parsell DA, Lindquist S. (1993)** The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of proteins. *Annual Review of Genetics* 27: 437-496.
- Parsell DA, Kowal AS, Singer MA, Lindquist S. (1994)** Protein disaggregation mediated by heat shock protein 104. *Nature* 372: 475-478.

Referencias bibliográficas

- Paul RE, Chen NJ. (2000)** Heat treatment and fruit ripening. *Postharvest Biology and Technology* 21: 21–37.
- Pearl LH, Prodromou C. (2000)** Structure and *in vivo* function of Hsp90. *Current Opinion in Structural Biology* 10: 46–51.
- Perkins DN, Pappin DJC, Creasy DM, Cottrell JS. (1999)** Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551-3567.
- Pesis E, Aharoni D, Aharon Z, Ben-Arie R, Aharoni N, Fuchs Y. (2000)** Modified atmosphere and modified humidity packaging alleviates chilling injury symptoms in mango fruit. *Postharvest Biology and Technology* 19: 93–101.
- Picard D. (2002)** Heat-shock protein 90, a chaperone for folding and regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences* 59:1640–1648.
- Pinto ACQ, Cordeiro MCR, Andrade SRM, Ferreira FR, Filgueiras HAC, Alves RE, Kimpara DI. (2005)** *Annona* species, Internacional Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, Southampton, UK.
- Porat R, Pavoncello D, Peretz J, Ben-Yehoshua S, Lurie S. (2000)** Effects of various heat treatments on the induction of cold tolerance and on the postharvest qualities of ‘Star Ruby’ grapefruit. *Postharvest Biology and Technology* 18: 159–165.

- Porat R, Weiss B, Cohen L, Daus A, Aharoni N. (2004)** Reduction of postharvest rind disorders in citrus fruit by modified atmosphere packaging. *Postharvest Biology and Technology* 33: 35–43.
- Prändl R, Kloske E, Schöffl F. (1995)** Developmental regulation and tissue-specific differences of heat shock gene expression in transgenic tobacco and *Arabidopsis* plants. *Plant Molecular Biology* 28: 73-82.
- Prasad TK, Stewart CR. (1992)** cDNA clones encoding *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays* mitochondrial chaperonin HSP 60 and gene expression during seed germination and heat shock. *Plant Molecular Biology* 18: 873-885.
- Pugh BF. (1996)** Mechanisms of transcription complex assembly. *Current Opinion in Cell Biology* 8: 303-311.
- Puigderrajols P, Jofré A, Mir G, Pla M, Verdaguer D, Huguet G, Molinas M. (2002)** Developmentally and stress-induced small heat shock proteins in cork oak somatic embryos. *Journal of Experimental Botany* 53: 1445-1452.
- Queitsch C, Hong SW, Vierling E, Lindquist S. (2000)** Heat shock protein 101 plays a crucial role in thermotolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 479-492.
- Queitsch C, Sangster TA, Lindquist S. (2002)** Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation. *Nature* 417: 618–624.

- Rabindran SK, Giorgi G, Clos J, Wu C. (1991)** Molecular cloning and expression of a human heat stress factor. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 88: 6906-6910.
- Ramji DP, Foka P. (2002)** CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochemical Journal* 365: 561-575.
- Ranson NA, White HE, Saibil HR. (1998)** Chaperonins. *Biochemical Journal* 333: 233-242.
- Reddy RK, Kurek I, Silverstein AM, Chinkers M, Breiman A, Krishna P. (1998)** High molecular weight FK506-binding proteins are components of heat shock protein 90 heterocomplexes in wheat germ lysate. *Plant Physiology* 118: 1395–1401.
- Rieping M, Schöff F. (1992)** Synergistic effect of upstream sequences, CCAAT box elements, and HSE sequences for enhances expression of chimaeric genes in transgenic tobacco. *Molecular and General Genetics* 231: 226-232.
- Ritossa F. (1962)** A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. *Experientia* 18: 571-573.
- Ritossa F. (1996)** Discovery of the heat shock response. *Cell Stress & Chaperones* 1: 97-98.
- Rojas A, Almoguera C, Jordano J. (1999)** Transcriptional activation of a heat shock gene promoter in sunflower embryos: synergism between ABI3 and heat shock factor. *The Plant Journal* 120: 601-610.

- Ron EZ, Segal G, Sirkis R, Robinson M, Graur D. (1999)** Regulation of heat-shock response in bacteria. *Microbial Biosystems: New Frontiers Proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology*. Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P (eds), Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada.
- Rozenzweig D, Elmaci C, Samach A, Lurie S, Porat R. (2004)** Isolation of four heat shock protein cDNAs from grapefruit peel tissue and characterization of their expression in response to heat and chilling temperature stresses. *Physiologia Plantarum* 121: 421–428.
- Rutherford SL, Lindquist S. (1998)** Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396: 336–342.
- Sabehat A, Lurie S, Weiss D. (1998)** Expression of small heat-shock proteins at low temperatures. *Plant Physiology* 117: 651-658.
- Sabehat A, Weiss D, Lurie S. (1998b)** Heat-shock proteins and cross-tolerance in plants. *Physiologia Plantarum* 103: 437-441.
- Salerno JC, Eifert CL, Salerno KM, Koretz JF. (2003)** Structural diversity in the small heat shock protein superfamily: control of aggregation by the N-terminal region. *Protein Engineering* 16: 847-851.
- Saltveit ME. (2002)** Heat shocks increase the chilling tolerance of rice (*Oryza sativa*) seedling radicles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 3232-3235.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Sánchez de Medina L, Plata MC, Martínez-Cayuela M, Faus MJ, Gil A. (1986) Cambios en la actividad polifenoloxidasa, peroxidasa, catalasa y fosfatasa ácida de chirimoyo durante la maduración a temperatura y humedad controladas. *Revisión de Agroquímica y tecnología de los alimentos* 26: 529-538.

Sanchez Y, Taulien J, Borkovich KA, Lindquist S. (1992) Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *The EMBO Journal* 11: 2357–2364.

Sapitnitskaya M, Maul P, McCollum GT, Guy CL, Weiss B, Samach A, Porat R. (2006) Postharvest heat and conditioning treatments activate different molecular responses and reduce chilling injuries in grapefruit. *Journal of Experimental Botany* 57: 2943–2953.

Scharf KD, Höhfeld I, Nover L. (1998) Heat stress response and heat stress transcription factors. *Journal of Bioscience* 23: 313-329.

Scharf KD, Siddique M, Vierling E. (2001) The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing α -crystallin domains (Acd proteins) *Cell Stress & Chaperones* 6: 225–237.

Schirmer EC, Lindquist S, Vierling E. (1994) An *Arabidopsis* heat shock protein complements a thermotolerance defect in yeast. *Plant Cell* 6: 1899-1909.

- Schirmer EC, Glover JR, Singer MA, Lindquist S. (1996)** HSP100/Clp proteins: a common mechanism explains diverse functions. *Trends in Biochemical Science* 21: 289-296.
- Schöffl F, Prändl R, Reindl A. (1998)** Regulation of the Heat-Sock Response. *Plant Physiology* 117: 1135-1141.
- Schubert R, Manteuffel R, Eich J, Häger KP. (2002)** Molecular characterization and evolution of the cytosolic class II 17.0 kDa small heat-shock protein gene family from *Picea abies* (L.) Karst. *Plant Science* 163: 1-12.
- Schultheiss J, Kunert O, Gase U, Scharf KD, Nover L, Rüterjans H. (1996)** Solution structure of the DNA-binding domain of the tomato heat stress transcription factor HSF24. *European Journal of Biochemistry* 236: 911-921.
- Shono M, Liu J, Sanmiya K, Singh I, Din J, Suzuki K, Tsukaguchi T, Egawa Y. (2002)** Functional analysis of mitochondrial small heat shock protein. *JIRCAS Working Report*: 17-23.
- Smýcal P, Masín J, Hrdý I, Konopásek I, Zárský V. (2000)** Chaperone activity of tobacco HSP18, a small heat-shock protein, is inhibited by ATP. *The Plant Journal* 23: 703-713.
- Sola MM, Gutiérrez M, Vargas AM. (1994)** Regulation of hexose-phosphate cycle determines glucose and fructose accumulation in cherimoya (*Annona cherimola* Mill) during ripening. *Journal of Plant Physiology* 144: 569-575.

- Sorger PK, Pelham HRB. (1988)** Yeast heat stress factor is an essential DNA-binding protein that exhibits temperature-dependent phosphorylation. *Cell* 54: 855-864.
- Soto A, Allona I, Collada C, Guevara MA, Casado R, Rodríguez-Cerezo E, Aragoncillo C, Gómez L. (1999)** Heterologous expression of a plant small heat-shock protein enhances *Escherichia coli* viability under heat and cold stress. *Plant Physiology* 120: 521-528.
- Stancato LF, Hutchison KA, Krishna P, Pratt WB. (1996)** Animal and plant cell lysates share a conserved chaperone system that assembles the glucocorticoid receptor into a functional heterocomplex with Hsp90. *Biochemistry* 35: 554–561.
- Stoll K. (1983)** Técnicas recents de la conservació de les Fruites i les verdures en Atmosfera Controlada. *Jornades Obertes sobre Frigoconservació de la Fruits*. Barcelona, pp. 65-69.
- Studer S, Obrist M, Lentze N, Narberhaus F. (2002)** A critical motif for oligomerization and chaperone activity of bacterial α -heat shock proteins. *European Journal of Biochemistry* 269: 3578–3586.
- Sugino M, Hibino T, Tanaka Y, Nii N, Takabe T, Takabe T. (1999)** Overexpression of DnaK from a halotolerant cyanobacterium *Aphanothece halophytice* acquires resistance to salt stress in transgenic tobacco plants. *Plant Science* 146: 81–88.
- Sun W, Bernard C, Van de Cotte B, Van Montagnu M, Verbruggen N. (2001)** At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can

enhance osmotolerance upon overexpression. *The Plant Journal for Cell and Molecular Biology* 27: 407-415.

Sun W, Van Montagnu M, Verbruggen N. (2002) Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 1577: 1-9.

Sun Y, MacRae TH. (2005) Small heat shock proteins: molecular structure and chaperone function. *Cellular and Molecular Life Science* 62: 2460–2476.

Sundby C, Härndahl U, Gustavsson N, Ahrman E, Murphy DJ. (2005) Conserved methionines in chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta* 1703: 191– 202.

Sung DY, Vierling E, Guy CL. (2001) Comprehensive Expression Profile Analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 Gene Family. *Plant Physiology* 126: 789–800.

Suzuki TC, Krawitz DC, Vierling E. (1998) The chloroplast small heat-shock protein oligomer is not phosphorylated and does not dissociate during heat stress *in vivo*. *Plant Physiology* 116: 1151-1161.

Takahashi T, Naito S, Komeda Y. (1992) Isolation and analysis of the expression of two genes for the 81-kilodalton heat-shock proteins from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 99: 383–390.

Török Z, Goloubinoff P, Horváth I, Tsvetkova NM, Glatz A, Balogh G, Varvasovszki V., Los DA, Vierling E, Crowe JH, Vigh L. (2001) *Synechocystis* HSP17 is an amphitropic protein that stabilizes heat-stressed membranes and binds denatured proteins for subsequent chaperone-

mediated refolding. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 98: 3098-3103.

Treglia A, Spano G, Rampino P, Giangrande E, Nocco G, Mita G, Di Fonzo N, Perrotta C. (1999) Identification by *in vitro* translation and northern blot analysis of heat shock mRNAs isolated from wheat seeds exposed to different temperatures during ripening. *Journal of Cereal Science* 30: 33–38.

Tsvetkova NM, Horváth I, Török Z, Wolkers WF, Balogi Z, Shigapova N, Crowe LM, Tablin F, Vierling E, Crowe JH, Vigh L. (2002) Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99: 13504–13509.

Ukaji N, Kuwabara C, Takezawa D, Arakawa K, Yoshida S, Fujikawa S. (1999) Accumulation of small heat-shock protein homologs in the endoplasmic reticulum of cortical parenchyma cells in mulberry in association with seasonal cold acclimation. *Plant Physiology* 120: 481–489.

Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L, Rocha-Sosa M. (1990) Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium-mediated* plant transformation. *Molecular and General Genetics* 220: 245-250.

van Montfort RL, Basha E, Friedrich KL, Slingsby C, Vierling E. (2001) Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nature Structural Biology* 8: 1025-1030.

- Vierling E. (1991)** The roles of heat shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology Plant Molecular Biology* 42: 579-620.
- Vigh L, Maresca B, Harwood JL. (1998)** Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes?. *Trends in Biochemical Science* 23: 369-374.
- Vinocur B, Altman A. (2005)** Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 123-132.
- Volkov RA, Panchuk II, Schöffl F. (2005)** Small heat shock proteins are differentially regulated during pollen development and following heat stress in tobacco. *Plant Molecular Biology* 57:487-502.
- Vuister GW, Kim SJ, Orosz A, Marquardt J, Wu C, Bax A. (1994)** Solution structure of the DNA-binding domain of *Drosophila* heat stress transcription factor. *Nature Structural Biology* 1: 605-614.
- Wang CY, Qi L. (1997)** Modified atmosphere packaging alleviates chilling injury in cucumbers. *Postharvest Biology and Technology* 10: 195-200.
- Wang L, Chen S, Kong W, Li S, Archbold DD. (2006)** Salicylic acid pretreatment alleviates chilling injury and affects the antioxidant system and heat shock proteins of peaches during cold storage. *Postharvest Biology and Technology* 41: 244-251.

Referencias bibliográficas

- Wang, W, Vinocur B, 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, Altman A. (2004)** Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Science* 9: 244-252.
- Waters E. (1995)** The molecular evolution of the small heat shock proteins in plants. *Genetics* 141: 785-795.
- Waters ER, Lee GJ, Vierling E. (1996)** Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* 47: 325-338.
- Wehmeyer N, Vierling E. (2000)** The expression of small heat shock proteins in seeds responds to discrete developmental signals and suggest a general protective role in desiccation tolerance. *Plant Physiology* 122: 1099-1108.
- Wehmeyer N, Hernández LD, Finkelstein RR, Vierling E. (1996)** Synthesis of small heat shock proteins is part of the developmental program of late seed maturation. *Plant Physiology* 112: 747-757.
- Wells DR, Tanguay RL, Le H, Gallie DR. (1998)** HSP 101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status. *Genes Development* 12: 3236-3251.

- Woolf AB, Cox KA, White A, Ferguson IB. (2003)** Low temperature conditioning treatments reduces external chilling injury of ‘Hass’ avocados. *Postharvest Biology and Technology* 28: 113-122.
- Wu C. (1995)** Heat shock transcription factors: structure and regulation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 11: 441-469.
- Xiao H, Lis JT. (1988)** Germline transformation used to define key features of heat-shock response elements. *Science* 239: 1139-1142.
- Yabe N, Takahashi T, Komeda Y. (1994)** Analysis of tissue-specific expression of *Arabidopsis thaliana* Hsp90-family gene *HSP81*. *Plant Cell Physiology* 35: 1207–1219.
- Yamada A, Sekiguchi M, Mimura T, Ozeki Y. (2002)** The role of plant CCT α in salt and osmotic stress tolerance. *Plant Cell Physiology* 43: 1043-1048.
- Yeh CH, Chang PF, Yeh KW, Lin WC, Chen YM, Lin CY. (1997)** Expression of a gene encoding a 16.9-kDa heat-shock protein, Oshsp16.9, in *Escherichia coli* enhances thermotolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 94: 10967-10972.
- Yeh CH, Chen YM, Lin CY. (2002)** Functional regions of rice heat shock protein, Oshsp16.9, required for conferring thermotolerance in *Escherichia coli*. *Plant Physiology* 128: 661–668.
- Young JC, Moarefi I, Hartl FU. (2001)** Hsp90: a specialized but essential protein-folding tool. *The Journal of Cell Biology* 154: 267–273.

- Yu JH, Kim KP, Park SM, Hong CB. (2005)** Biochemical analysis of a cytosolic small heat shock protein, NtHSP18.3, from *Nicotiana tabacum*. *Molecules and Cells* 19: 328-333.
- Zandi E, Tran TN, Chamberlain W, Parker CS. (1997)** Nuclear entry, oligomerization, and DNA binding of the *Drosophila* heat shock transcription factor are regulated by a unique nuclear localization sequence. *Genes & Development* 11: 1299-1314.
- Zarsky V, Garrido D, Eller N, Tupy J, Vicente O, Schöffl f, Heberle-Bors E. (1995)** The expression of a small heat shock gene is activated during induction of tobacco pollen embryogenesis by starvation. *Plant, Cell and Environment* 18: 139-147.
- Zhang C, Guy CL. (2006)** *In vitro* evidence of Hsc70 functioning as a molecular chaperone during cold stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 44: 844–850.
- Zhang J, Huang W, Pan Q, Liu Y. (2005)** Improvement of chilling tolerance and accumulation of heat shock proteins in grape berries (*Vitis vinifera* cv. Jingxiu) by heat pre-treatment. *Postharvest Biology and Technology* 38: 80–90.
- Zhang Z, Quick MK, Kanelakis KC, Gijzen M, Krishna P. (2003)** Characterization of a Plant Homolog of Hop, a Cochaperone of Hsp90. *Plant Physiology* 131: 525–535.
- Zhao C, Shono M, Sun A, Yi S, Li M, Liu J. (2007)** Constitutive expression of an endoplasmic reticulum small heat shock protein alleviates endoplasmic

reticulum stress in transgenic tomato. *Journal of Plant Physiology* 164: 835-841.

Zhou J, Pesacreta TC, Brown RC. (1999) RNA isolation without gel formation from oligosaccharide-rich onion epidermis. *Plant Molecular Biology Reporter* 17: 397-407.

Zivy M, de Vienne D. (2000) Proteomics: a link between genomics, genetics and physiology. *Plant Molecular Biology* 44: 575–580.

VIII. ANEXOS

ANEXO I. Alineamiento de sHSPs de distintas especies vegetales:

Clase I: 1. *A. comosus* (AY098528), 2. *F. ananassa* (U63631), 3. *L. esculentum* (AF123257), 4. *A. thaliana* (NM_114492), 5. *H. vulgare* (X64560), 6. *L. peruvianum* (AJ225047), 7. *T. aestivum* (X13431). **Clase II:** 8. *F. hygrometrica* (AF089845), 9. *O. sativa* (DQ180746), 10. *P. glauca* (L47740). **Clase III:** 11. *A. thaliana* (NM_104282). **Clase M:** 12. *G. max* (U21722), 13. *P. sativum* (X86222), 14. *Z. mays* (AY758275). **Clase P:** 15. *N. tabacum* (D88584), 16. *O. sativa* (AB020973), 17. *T. aestivum* (X58280). **Clase ER:** 18. *P. sativum* (M33898), 19. *S. lycopersicum* (AB026983). En azul se representa la región consenso II y en verde la región consenso I.

	1	72
1	-----	
2	-----	
3	-----	
4	CATTCAACTTTAATTCGATTTTCTTCAAATTTCCAGTTTCCACTTGCTTTCATTGCTTCTTTCCCGCGTTT	
5	-----AAACTTTCATTTGTATTTAATTACTCACATTAGATTTTACTCATTTTTTTGCTATAAAT	
6	-----	
7	-----	
8	-----	
9	-----	
10	-----	
11	-----	
12	-----	
13	-----	
14	-----	
15	-----	
16	-----	
17	-----	
18	-----	
19	-----	
Consenso		
	73	144
1	-----	
2	-----	
3	-----	
4	CTAGATCTTCAATCGAGAAAGGATTTGCAACTTTTCACACAAAAATCTTAGATTAATTGTTATTAATAACT	
5	ATATAGGTGTAGAGAATTTAAGATGTCCATGACCACCCGACCACCCGCTAGCTGCGTCATGTGTAGTAC	
6	-----	
7	-----	
8	-----	
9	-----	
10	-----	
11	-----	
12	-----	
13	-----	
14	-----	
15	-----	
16	-----	
17	-----	
18	-----	
19	-----	
Consenso		

145

216

1 -----
 2 -----
 3 -----
 4 TGTTCATCAAACCACTAAAAATCCCGTGCATCTTCGACTTCTTGGTTAAAAATCAATAAAGAGTGTAACCT
 5 TCTTTCTGTTTTTAAAAATAAGTGTCTGAACTTTATACTAACTTTAATATAAAAAATTGTACTAAACTTGAGACA
 6 -----
 7 -----
 8 -----
 9 -----
 10 -----
 11 -----
 12 -----
 13 -----
 14 -----
 15 -----
 16 -----
 17 -----
 18 -----
 19 -----

Consenso

217

288

1 -----
 2 -----
 3 -----
 4 TTCATTGCTATAACTTAATAATTTGTTTGTGAGAAGAGAAGCTTAGTCTTACAGGGACCAACACCAACAATC
 5 TTTATTTAGACGGAGGGAGTAGTATTTATTTACGTTTAACTATTGTACTTGCTCGCTGTAACCTTTAATGAC
 6 -----
 7 -----
 8 -----
 9 -----
 10 -----
 11 -----
 12 -----
 13 -----
 14 -----
 15 -----
 16 -----
 17 -----
 18 -----
 19 -----

Consenso

289

360

1 -----
 2 -----
 3 -----
 4 AAAATTTAGATAATGAAGAATAGTTGCTGATGCATGCATGATTAAGATTGAATTTATCAACAAAAGATAAGT
 5 AGATAACCTCTACTGTTAATCATGCTATTCTGGAAACGGCCCCACAACCCATCTTGAATCTAGACTAGTCG
 6 -----
 7 -----
 8 -----
 9 -----
 10 -----
 11 -----
 12 -----
 13 -----GATAGAATCGCGGCCGCTTCTACTCCCTACCTTTCTCTCCTTCAAATACAA
 14 -----
 15 -----AATCCATAAAAAAAT-ATCG
 16 --AAGCAATCAAGCGACGATAATTAGAGCACTCGCGACCTC----TCCGACGATCTCCAGCTCACTGCTTT
 17 -----AATTCGCGGCCGCTCGGCTTCCAAGTTCCAACGATCTCGTAGACT-CTCT
 18 -----
 19 -----

Consenso

361

432

1 -----
 2 -----
 3 -----
 4 GTTCATTATACAACACGTGATTAATTGCATGGTGTATTAAAGCCATTAACGAAGTCCATGGTAAATGAACGG
 5 CCCCCTTGCTGGAATTATACAATTATTTATAGAAAAATCTCACAAAAAAATTTATTAACAAAAAAGGGGA
 6 -----
 7 -----
 8 -----
 9 -----
 10 -----
 11 -----
 12 --GGAGACAAAGATTTTT--TCCCAGC--TTGCTC-A---TCAAGTC-CAAGAACCAACCTACCTTTTGC-
 13 CCGCCTCTCCCATTTTGGGGTAACAGAATTTGCAG-AA--TCCATTCTCTACTCTTAAACAACAATCTTC-
 14 -----ATGGCTTCCATTGTGCTTCCAGGAGGGCCGTTCTCTAGTTCGCGCT
 15 TGTGATCG--AGCTATCT-TTCTGGATTTGTTTTAGTTTTATAATGGCTTGCAAAACTCTTACATGTTCA
 16 TAGGTTT-TCAAACTCTGA-TTCTCTCTACTCTGTA--GTGCAATGGCTGC-----TCCATTTCG-
 17 --CGTT--TCAATCTCGAG-CGACTTTTATTATTTCAA-GTGCAATGGCTGCAGCGAACGCTCCCTTCG-
 18 -----
 19 -----

Consenso

433

504

1 -----
 2 -----
 3 -----
 4 CATGGCGTTCACTACCCACCTTAATGAACTGCATGTCGCTCAACCATCAACATAGAAGCTTCTTGAAGCCA
 5 GAAGGCGCCTAACGGCAGGTTCTGTAGTCCCTGGAAGACGATAGACCCTTCGAGGGTTGGGAACAGGAAA
 6 -----
 7 -----
 8 -----
 9 -----
 10 -----
 11 -----
 12 -----AATCTCAAT-T-----CAATGGCGTCCTC-----TCTCATGCGAAGCGCTTCCCTCTCCTCTTCC
 13 -----TCCCGCAATCT-----CAATGGCTTCCTC-----ACTTGCACTCAAGCGATTCCCTCTCTCCGGC
 14 CTGGAGAAGCTCATCGCAGCGTCTCCGCTCCCGGGACTGGCTCCGCCCTCAGGCCGTTGGCAGTCGCGGGC
 15 GCAGCTTCTCCTTAGTAGTTAATGGTGTACAGCGTCTCTAGGAGTAACAACAGGGTAG-CTGCGCCTTT
 16 -----TCTCGTCAGCC--GTGCTCTCGCCAGCGCGCGGCTCCCCATCCGCGCGCTGGAGGAGCGAGCC
 17 -----TCTCGTCAGCC--GCCTCTCCCGGCGCGCGCTGCCCATCCGTGC---CTGGAGAGCCGCGAG
 18 -----
 19 -----

Consenso

505

576

1 -----
 2 -----
 3 -----
 4 CCTGAGAAATCTGGTAGCGACTCTTGAAAGACACGTTATAAAGAAACGGAAAGAAGAAACCTGAAATTTT
 5 GAACGAATGGCTCACAGCCTACCTGAAAGCGAAAGAGAAACAACACTCGTGGATTGGACAGTCTCGAGA
 6 -----
 7 -----
 8 -----
 9 -----
 10 -----
 11 -----
 12 CTCTCTCCAGGTCCTCC-----TTCGCCCGC-----CG-----CTTCCGCTTCCCAC
 13 TTCTTTCAAGCTCTTTTC-----TTCGCCCGT-----CG-----CCTCTTCCGCTTCC
 14 GGCTCCGCGGCTACAACACCGGCGTCCGCTCCGACGCTACGAGGGGGCCGAGTCGGAAGACGATAGCGTC
 15 CTCTGTTTTCTTTCCATCCACATGCAACGTGAAAAGGCCAGCGTCTAGGCTTGT---AGTTGAGGCAACTGG
 16 GACGGTCCGGCTCCCGTCTCG-----GGGAGGGCCCGCCAGCTCGCCGTG-----GCCTCCGCGGCGCA
 17 GCCGGCGCGCTCTCGACCGG-----GGGAGAACC CGCCGCTCTCCGTG-----GCCTCCGCGGCGCA
 18 -----
 19 -----

Consenso

1 -----ATCAAGTGAAGCAAGCAGGCAGTCTCATCGG--AACAAATCC-ATCCATCTAAAC
2 -----AAGCAACCAAGTCAATATCCGATTCTAGC-----CTACAAACAAATCAAAGTTTC
3 -----GATCCAAAATCGAAAGCAGCA--AGCAAAAAACGTAGAAAATTC
4 AAGAAACTTGCAGAGCTTCTATCTCTTATCCTCTTCTACCATCATTTCTCCATAAATCGCAACGC
5 TTCTTCAAGATCAGTACCTACGATGCTATAAGTAGTGGCTCACCTTCCATCGCCCTCCCACTCAAGCCAGC
6 -----
7 -----
8 -----TTC--GGCAGAGGTTTTTACACTTGTC
9 -----CCCAGCGGATCCGAGG--TAGAAGAGAGAAAGAGAGA
10 -----ATCAATCC--GACATTCTGCGATTGTTGATTC
11 -----C--CATACTATCAATCGAAGA-AG
12 CGTCTCT---TTCGACACCACGCCATGCGCCAGTATGACAAACCGCG--CCGACGACCACGACCCGA---
13 CGTCTCT---TTCAACACCACGCCATGCGCCAGTACGATCAACACT---CCGATGACCGTAACGTTGA---
14 CGCGAGTACGATGGGCGGCACGGCGGCGGGACTACGCTGTGCCAG--CCTGTTCTCAGGTAGTCGTCAT
15 AGAT-----AACAAAGATACTTCAG--TTGACGTGCATGTCAGCA--GCGGTCAGGAGGAAACAACAA
16 GGAG-----AACAGGGACACACCCCGCTCGATGTCCACGTC AACCC--AGG-----ACGGCGGGAACCA
17 GGAG-----AATAGGGACAACTCCG--TCGACGTCCAAGTCAGCC--AGGCCAGAACGCCGCAACCA
18 -----CCAAGTCCAACCTCAAGAACAAAAACACACATTT--CTAAGTATGAGTCTGAAACCTC
19 -----TC--ATCAATACTACAGTGTATAGTA

Consenso

A C A A A G A

1 C--CTCTGA-AGAAGCGTC--GTCTTCGGAAG---CGATCATCATGTCT---C--TGG---TTCGGCGAA
2 A--AGAACCTTTCATCGTT--CA--ACAGCAATG-GCTCTAAGTCTCTTT---G--GCAA-TAGCCGACGCA
3 T--CAAAAAGTTCACTGA--AA--ATGTCTCTG-ATCCCAAGAAATTTTC---G--GCGA-TCGACGAAGCA
4 A--CATAAGTGTTCATTCGAAGAGAGTCTAGCAAAAACAAAACAAAC--AGAGCAACAGAGTAAGCC
5 CAGCGTCAAAACCAAGCGAACAACATCCTACCCTACAATCCGATACAGATT---AATTTCAACCGAGCTACA
6 -----CATATAAAATTTCTCAAAAAGCTCACT
7 -----GAATTCCTTTTCTACTACGATCCGATACCGAATTTTCCGAGCGCACAAG
8 G--AGAGTGACGGTGCAGAG-TTCCATATCCCTG-ATTGGATTGGTCTTG---GTGTTTC-TCT-GGTCGAT
9 A--GAAGAAGAAGAGGCGA--TCGAGAGATGGAG-AGCGCCATGTTT--G---GGCTGGA--GACGCCCT
10 C--AGAAT-ATTAATTC-----TTTGAAATTC-CGGGAAAGATATTTG--A--TAGA-TGGCAATGGAT
11 A--GGAAGATCCAATTGGA--AAGGGTTATCCTA-ATTCACAGTCA-----TTGA-TCGGAGAAGAT
12 ---CATCGATC--GTCACT--CCGACGCTCTTT-CCCTAGCACTGC-GC---GCCGCGA-C-GATAT-CTT
13 ---TGTTTATC--GTCACT--CC-----TT-CCCTCGCACT---C---GCCGCGA-T-GATCTTCTT
14 C--TTCGCTTC--ATGCCAGACCCATTTGCTTTG-CTCTCTCAACTCTCA---AATGAGATGGTGGTGAGAC
15 C--CAAGCAGTACTTCTG--TCGACCGCCGCTC-TAGGAAGAT---GT---CTCTTGA-----TGCTCTC
16 G--CAGGGGA---ACGCCG--TGCAGCGCCGCC--GCGCCGCTCGTCGGC---GTTTGA-C-GGCATCTCC
17 G--CAGGGCA---ATGCAG--TCCAGCGCCGCC-TCGTCGCGC---TG---GATTTGA-----CATCTC
18 ---TAAACATGTTACTCGT--TCCATTTCTTCTG-CTTATTCTCGCGGCT---GATTTTC-CTTTGAAAGCA
19 T--GAGGGTCATCAGCAAATTAACATTGCTCATC-ATTTCAATTGCTTGC--ATTTTTC-AGGTATCATCA

Consenso

A A A T C T GA G GC

1 GCA-A-C---ATCT-TCGATCCCT-----TCTC-----CCTCGACCTGTGGGAGCCCTTCG-AG---
2 GCA-A-C---GTCT-TCGATCCCT-----TTTC-----CCTCGACACCTGGGACCCCTTTC-AG---
3 GCA-G-C---ATGT-TCGATCCAT-----TTTC-----AATCGACGTATTTGATCCATTCA-GG---
4 AAACGATGTCTTAGTTCGAGCTTTTTTGGAGGCCGA--AGAACAAAACGTGTTCCGACCCATTTTCACTAG
5 AACCAAAAGCAAGCAACACCGACAAATGTCGATCGTGAGG--AGGAGCAACGTGCTGAGCCCTTC-----
6 GAA-AATGTCTCTGATCCAGAAATTTTCGGCGATCGACGAAGCAGCAGCATGTTCCGATCCATTTTCAATTG
7 CCAAACCAAAGCAAAACCTGACGATGTGATCGTGAGG--CGGAGCAACGTGTTCCGACCCCTTC-----
8 TTG-A-----GAGGATGGATTTTC-----CTTTG---TTCCAGATCCTGAGCTTTCCCGATG-A---
9 GAT-GACCGCGCTGCAGCACCTGCTCGA-----CATCC-----CCGACGGCGAGGGCGCGCCGCGG-AG---
10 -----CCTCTGT-TGAACACCG-----TGCA-----GCAGCTGCTGGTTG-TGCCGG--AC---
11 GAG-TGC-----TGTTCGATTAACAC-----TTTT-----TTGGCTTACCGGAGGCGATCG-A---
12 -TC-T-CAGATGTGT-TGGATCCATTT-----TTTC-----CGACTCGGAGTTTGAGCCAGGTT-CT---
13 CTC-T-CAGATGTGT-TCGATCCGTTT-----TCTC-----CCCCACGGAGCTTAAGTCAAGTC-CT---
14 TAC-ATCGCTTCGAAATGGCTGTGCTGAGTGTGACTT--CGTCTTGTGTTGTTCCGTTCCAGATA-TTTTC
15 CCT-T-TCGGATGT-TAGACCCAATG-----TCTC-----CGATGAGAACAATCGGGCAGATG-AT---
16 C-G-T-TCGGCTCG-TGGACCCGATG-----TCGC-----CGATGCGGACGATCGGGCAGATG-CT---
17 CCG-T-TCGGGCTAG-TGGACCCGATG-----TCGC-----CGATGAGGACGATCGGGCAGATG-CT---
18 AAA-G-CATCACTACTACCAATTCATAGA---TCTCCC---AACTACTCTTATCGATCCTCGGTGTT-CTGAT
19 CTA-AGCGCAGATGGGTCATCACTT-----GTACCCTAATCATAGACCAAAT-GATAA

Consenso

C TG TCGA CC T T TC C C CGTG GA CC

1 --GGCTT-CCCCTTCGGCGGCGCCCTCTCGTTCCCGC--GCCCCTCGGCGT--CCTTCCCCGGG--AGA
2 --GGATT----TGGC-----CCTCTCATGAACTCCT--C--CTCCACC-----GCCGGC--ACA
3 --GAATT----AGGC-----TCCACGGTACCAA-----TTCAG-----GGG--AGA
4 ACGTATGGGATCCGTTCAAGGATTCCTTGACGCCGG-----GTTGACAA--ACGCACCTGCCA--AGG
5 --GCCGACCTCTGGGCCGACCCCTTGGACACCTTCCGCTCCATCTTCCCGGCGATCTCAGGCGGGA--ACA
6 ACGTATTTGATCCATTCAGGGAATTAGGCTTCCAGGTACCAATTCAGG-----GG
7 --GCCGACCTTTGGCGGACCCCTTCGACACCTTCCGTTCCATCGTCCCGGCGATCTCAGGCGGCAGCAGCG
8 -----GCTTGAGAAGTCGTTGAATCCA-----CAGTCCAGAA--GTATGTGCGTG--ACA
9 -----AAGCAGGGCGGACCCGTTGGCCGA-----CGCGTGC--GTACGTGCGC--ACG
10 --GACCTGGAGAGGA-----TCTCCACGCCCG-----ACTCGCTC--TTATATGCGG--ACA
11 --GAAGCTAATCTCCGATTTCTCGTTCCGGCGAAA--GTAATAACGAG-----AGTCTGG--AA-
12 --GAACATGA-TGGACCAGGTCTGGACAATCCGT---TCCTCTCCGCGTC--GCGCGGGATC-----
13 --AAACATGA-TGGATTACTGACGGACAATCCGG---TCCTTTCTGTC-T-----
14 CGTATCCGCTTAGTGGCCCGCACAGCATTGGCCGCTGCTGAACCTTGTGG--ACGACTTGGCGG--TGG
15 --GGACACTA-TGGACAGACTGTGGAGGATACCA--TGACATTCACAGG--AAGGAACAGATC--A-T
16 --GGACACGA-TGGACCGGATGTTCGACGACGTCCGCTGGGGTTCCTCCGCC--ACGCCGCGGAGG--TCG
17 --GGACACGA-TGGACCGGCTGTTCGACGACGCCG---TGGGGTTCCTCC---ACGCTCGCTCCG--CCA
18 --CGTTTCCAGATCCGTTTCGCGTCTTAGAACAAAT--TCCTTATGGAGT--TGAGAAACAGGA--ACC
19 --CGAGCAATCCGGCTAATACATTTCTTGTATCCATTCAAAG-TTTTAGAACA--AATACCATTGG--ATT

Consenso

1 CA-GCGTCGTTCCG--GGGCGCCCGCATGATTTGGAAGG--AGACGCCG-GAGGCGCACGTGT--TCAAGG
2 CC-TCAGCCTTCGC--GCAGACTCGAATCGACTGGAAGG--AGACTCCG-GAGGCTCATGTCT--TCAAGG
3 GC-TCTGATTTTC--CAACAACGAATGACTGGAAGG--AAACTCCA-GAAGCTCATGTGT--TCAAGG
4 ACGTGGCAGCGTTCAACAACGCTAAAGTGGACTGGAGG--AGACCTT-GAAGCGCATGTGT--TCAAGG
5 GCGAGACAGCTGTTTCGCGAACGCGGGATGGACTGGAAAAGGAAGACGCTTGAAGGCATGTCT--TCAAGG
6 AGACCTCTCGGTTTGCCAAACACTCGAATGACTGGAAGG--AAACTCCA-GAAGCTCATGTGT--TCAAGG
7 AGACGGCCGCGTTCGCCAACGCCCGTGTGGACTGGAAGG--AGACCCC-GAGGCGCACGTCT--TCAAGG
8 CC-AAGGCCATGGT--TAGCACAGCTGTGGACGTCAAGG--AGCTTCCCAGTGTTCATCT--TCGTGG
9 CCGCGC-CCATGGC--GGCGACCCTCCGCGACGTGAAGG--ATCTGCCCGGGCGTACCGCT--TCGTGG
10 CC-GAGGCCACGGC--TTCGACTCCCGTAGATGTTAAAG--AATACCCC-AACTCTTATGTCT--TTATAG
11 ---GAGGAAGTAGCAATAATATCCAAATAGACTTTTGG--AATCTCC-AAAGAATACATAT--TTTATC
12 ---GGAGTGGCG-----CTGGAGTGTTCGCGGATGGGACGCGAGGGGACAGAGGATGCTCTGCATCTGCGCG
13 -----GCTTCGC-----GA-CGCGGATGGGATGCGAGAGAGACAGAGGATGCTCTGTTTCTCCGTT
14 CGGCGCCAGGTCT--GCGGTGCGCCGTGGCTGGAACCGCAAGGAGGACGAGGAGGCGCTGCACCTGAGGG
15 CAGCAGTAGGG-----GAAATAC-GTGTCTCTTGGGACATCAAAGACGATGAAATGAAATCAAGATGCGGT
16 CTGGCGACGGG--G--GAGGTGC-GGATGCCGTGGGACGTCATGGAGGACGACAAGGAGGTGAGGATGCGGT
17 CGCGC-CCAG--C--GAGACGCGGATGCCGTGGGACATCATGGAGGACGAGAAGGAGGTGAAGATGCGGT
18 ATCCATAACATTGTACA-TGCTAGTAGTACTGGAAGG--AAACTCCA-GAGGACATGTGA--TAATGG
19 AGAAAACACTCTGCT---CGCGAGAGTCTGACTGGAAGG--AGACGGCG-AAGGGACACGTGA--TAAGCG

Consenso

1 CCGATCTGCCGGGGTGAAGAAGGAGGAGGTGAAGGTGAGGTGAGGAGGGCA-----ACGTCTGCAGA
2 CGGACTGCCCGGACTGAAGAAGGAGAGGTGAAGGTGAGCTGGAGGAGGGGA-----ATGTCTTCAGA
3 CTGATCTTCCAGGGCTTAAGAAGGAGGAGGTCAAAGTGAAGTGGAGGAGGATA-----GGGTTCTCAGA
4 CGGACGTGCTGGGCTTAAGAAGGAGAGGTGAAGGTGAGGTTGAAGATGTA-----ACATACCTCAGA
5 CTGATCTTCTGGCGTGAAGAAAGAGGAGGTCAAGGTGAGGTGAGGAGCGCA-----ACGTGCTCATCG
6 CTGATCTTCCAGGGCTTAAGTTGGAGGAGTAAAAGTGAAGTGGAGGAGGATA-----GGGTTCTCAGA
7 TCGACCTCCCAGGCGTGAAGAAGGAGGAGGTCAAGGTGAGGTGAGGAGCGCA-----ACGTGCTCGTCCG
8 CTGACATGCCAGGGCTGAAATCAGCAGCGTGAAGGTGAGTTGGAGAAATGATA-----ATGTCTCGTGA
9 TGGACATGCTGGCTCAAGTCTCCGACATCAAGGTGAGGTGAGGAGGAGGA-----GGCTGCTGGTGA
10 TCGACATGCCCGGCTTAAATCCAAACGACATCAAGGTTCAAGTGGAGAGCGAGA-----ACATTCGAACA
11 TCGATATCCCAGAAATTTCAAAATCAGATATCCAGGTTACAGTGGAGGAGAGAGGACTTTAGTGATAAAGA
12 TGGACATGCTGGGCTCGCCAAAGGAGACGTGAAGATCTCCGTGGAGCAGA-----ACACTCTCATTGA
13 TGGATATGCTGGACTCGGTAAAGAAGACGTGAAGATCTCTGTGGAACAGA-----ACACTCTTACCA
14 TGGACATGCCAGGCTGGGGAAGGAGCAGTCAAGGTGAGGCGGAGCAGA-----ACAGCCTGGTGA
15 TTGACATGCCGGGCTCTCTAAAGATGAAGTGAAGGTATCTGTGGAAGATG-----ATTGCTTGTCA
16 TCGACATGCCGGGCTTTCGCGGGAGGAGGTGAAGGTGATGGTGGAGGACG-----ACGCGCTCGTCA
17 TTGACATGCTGGGCTTTCGCGGGAGGAGGTGAGGTTGATGGTGGAGGACG-----ACGCGCTGGTCA
18 TGGACGTGCCGGTGAAAAAGATGATATAAAGATAGAAAGTGAAGAGAAATA-----GGGTCTAAGAG
19 TAGAGTACTCTGGATTGAATAAAGATGATATAAAGATCGAAATTGAAGAAAACA-----GAGTGTGAGAG

Consenso

T GACATGCC GGGCTG AAGAAGGA GA GT AAGGTG AGGTGAGGGA G A ACGTGCT A

1009

1080

1 TCAGCGGCGAGCGCA-----CCAGGGAGAGGAGGAGAAGAACGAC-----ACCTGGCACCGCGT--GG
2 TCAGCGGAGAGAGGA-----GCAAGGAGCAGGAGGAGAAGAACGAC-----AAGTGGCACAGGCT--GG
3 TCAGCGGAGAGAGGA-----ACGTGGAGAGGAGATAAGAATGAC-----AAGTGGCATCGCGT--GG
4 TAAGCGGTGAGAGGA-----GCAGTGAGAAATGAAGAGAAGAGTGAC-----ACATGGCACCGTGT--GG
5 TCAGCGGCGAGCGCA-----CCAAGAGAGAGGAGGACAAGAACGAC-----AAGTGGCATCGGCT--GG
6 TCAGCGGAGAGAGGA-----ACATGGAGAAAGAGATAAGAATGAT-----AAGTGGCAGCGCT--GG
7 TCAGCGGCGAGCGGA-----GCAGGGAGAGGAGGACAAGAACGAC-----AAGTGGCACCGCGT--GG
8 TTGGCGGCACACGAA-----AACGTGAGGAGCCAGATCCTAAGGTA-----AAATATATTTCGAT--GG
9 TCAGCGGGAGCGCGCGGCGCGGCGGGAGGAGGAAGGAGGAGTCTGTG--AAGTACCTGCGGAT--GG
10 TCAGTGGCGAGCGGA-----AGAGGAACGAGAGGAGAGAGGGGAGAGTG--AAATACATCCGCAT--GG
11 GTAATGGGAAGAGGA-----AGAGAGATGATGATGAGAGTGAAGAAGGGT-CTAAGTATATTAGACTCGAG
12 TCAAAGGTGAAG-----GTGCTAAAGAGGCGA-----TGAAAGAGAGA-----
13 TTAAGGGTGAAGAAG-----GTGCTAAAGAAAGCGA-----GGAAGAGGAGAA-----
14 TCAAAGGGCGAGGCG-----AGAAGGAGGATAGCGAGGA-----CGAGGCCGCC-----
15 TCAAAGGGCGAATACA-----AAAAGGAAGA-GACTG-----GAGATGACAACCTTTGGG
16 TCCGCGGGGAGCACA-----AGAAGGAGGAGGCGAGGGCGCGGAGGGCTCCGGCAGCGGTGTGGAAGG
17 TCCGCGGGAGGCACA-----AGAAGGAGGCGCGCAGGAGGCGAGGGCGAAGGCGGCGGCGGGAAGG
18 TGAGTGGTGAGAGGA-----AGAAAGAGAAGATAAAAAGGAGATC-----ATTGGCACAGAGT--TG
19 TGAGCGGAGAGAGGA-----AGAAAGAGAAGAGAAAATGATGAGAGA-ATCATTTGGCATTTGT--TG

Consenso TCAGCGG GAG GGA A A GGAGGA GA GA AA A GA AAGTGGCA CG GT GG

1081

1152

1 A-GCGCAGCAGCGGCAAGTTCCTACGCAGTTCCGCCCTCCCGA-CAACGCC--AAGTTCGATCAGGTTAAG
2 A-GAGGAGCAGTGGCAAGTTCGTGAGGAGGTTCCAGGCTGCCGGA-CAATGCA--AAGTGGATCAGGTTAAG
3 A-CGGAAGCAGCGGAAATTCATGAGGAGATTTAGACTTCCGGA-GAATGCA--AAGATGGATCAAGTTAAG
4 A-CGGTCAAGTGGAAAGTTCATGAGGAGGTTCCGGTTGCCAGA-GAATGCA--AAGTGGAGGAGTTAAG
5 A-CGCGAGCAGCGGAAAGTTCGTGCGCGGTTCCGCCCTCCAGAGGACGGC--AAGTTGATGAGTGAAG
6 A-CGGAAGCAGCGGAAATTCATGAGGAGATTTAGACTTCCGGA-GAATGCA--AAGATGGATCAAGTTAAG
7 A-CGCGCAGCAGCGCAAGTTCGTGCGCGGTTCCGGCTCCGGAGGACGCC--AAGTGGAGGAGGTTAAG
8 A-CGCAACTCCGGATTCATTCAGGCAAGTTACGCTTCCCA-GAATTC--AATTTGGATAAAATGCA
9 A-CGCGCAGGATGGCAAGTTCATGCGCAAGTTCGTGCTCCCGA-CAACGCC--AAGTTCGATCAAGTCTCC
10 A-CGCGCAGAGTGGAAAGTTCATGAGGAAATTCAGCTTCCGGCTGACTGC--AACTGGAGGCCATCTCT
11 AGGAGACTTGCTCAGAAATTTGGTTAAGAAGTTCGGGTTACCAGA-AGATGCT--GATATGGCTTCTTAACG
12 ---G---CGTCTGTCGTTACTAGCAGGATTTGACTTCCCGGACAAGCTTACAAAGATTGACAGATCAGA
13 --AAG---TGGTCTCGATTCTCGAGCAGAAATGATTACCTGAAAAGCTTTACAGATTGATGTGATTA
14 ---CGC---CTCCGAGATACAGCGTGCATCGAGCTCGCCAGAGGTTTACAGGATGGACAGATCAAG
15 G-CAGGAATTACAGCTCCACTACGATACTGTTAAGTCTCCAGATAATGTTGAGAAA--GATAAAATTA
16 A-CGCGCAGCGTGAAGCTTACGACATCGCGCTCGCGCTCCCGACGAGTGCACAAAG--AGCAAGGTCCCG
17 A-CGCGCAGCTGAGCTTACGACATCGCGCTTTGCTCTCCGGACGAGTGCACAAAG--AGCCAGGTCCCG
18 A-AAAGATCTTATGAAAGTTCGTGAGGAGTTTAAATTAACCTCA-AAATGTT--GATTTGGATTTCTCA
19 A-AAGGATCATGAAAGTTCGTGAGACAATTTCTGTTGCCGTA-AAATGCT--GATATTGATACAATGAAA

Consenso A GCG AG GG AA TTC TGAGGAGGTT G CT CC GA GAATGC AAG TGGAT A GT AAG

1153

1224

1 GCCGCCATGGAGAACGGCGTGTCCACCGTACCCTGCCAAAGGAGGACGTC---AGAAGCCCCAGGTTAAG
2 GCTGCTATGGAGAAATGGGGTGTACTGTGACTGTGCCAAAGCACCGGAG---CCGAGCCCCAGGTTAAG
3 GCTTCAATGGAGAACGGAGTGTACTGTACTGTTCCAAAAGAAAGGAGTG---AGAAGCCTGAGGTTAAG
4 GCGAGTATGGAGAAATGGGGTGTGTGCGTTACGGTCCGAAAGTTCAGGAG---AGTAAGCCGAGGTTAAG
5 GCCGACTGGAGAACGGTGTGCTCACCGTACCCTGCCAAAGCCGAGGTC---AAGAAAGCCGAGGTTAAG
6 GCTTCAATGGAGAAATGGAGTGTACTGTACTGTTACAGTTCGAAAGAAAGAAATG---AGAAGCCTGATGTGAAG
7 GCCGGGCTGGAGAACGGCGTGTCCACCGTACCCTGCCAAAGGCCGAGGTC---AGAAGCCGAGGTTAAG
8 GCCTCTGTGTCAATGGCATCTAACAGTTACTGTTCCCAAGATTCCTCTCTCCAGACCTCGGAGCCGAGA
9 CCGTGTGCCAGGACGGCGTGTCCACCGTACCCTGCCAAAGCTCCCGCCGCGGAGCCCAAGACCCAAAG
10 GCTGCGTGCCAGGATGGAGTGTGACCGTACCCTGCCAAAGCTCCCGCCAGGAGACCCGAAAGAACTAAG
11 GCTAAATATCAGAAGGTGTTTGTACAGTTGTTATCAAGAAAGTACCGCCAC---AGCCGCGAAACCTAAG
12 GCTGAGATGAAGAACGGTGTGCTCAAGTCTGTTGCGGAAATGAAGGAGGAAGAGAGGAAGAACGTTGATC
13 GCTGAGATGAAAAACGGCGTGTCAAGTACTGTGCTTAAATGAAGGAAGAAGAAAGAAACAAATGTCATT
14 GCCGAGATGAAGAACGGCGTGTCAAGTGGTGTGCGGAAAGTGAAGGAGCAGCAGCCGAAAGACGTTCT
15 GCTGAACGAAGAAATGGAGTCTTTTCATCTCAATCCGAAGACCAAAGTTGA-----GAAGAGGTGATT
16 GCCGAGCTCAAGAACGGCGTGTGCTGCTCACCGTCCCGAACGAGCAGGAGGTTGA-----GCCAAGGTGATC
17 GCCGAGCTCAAGAACGGCGTGTGCTGCTGCTCCGTGCTCCCGAACGAGGAGACCGA-----GCCAAGGTGATC
18 GCTAAAGATGAAGAACGGCGTGTCAAGTGGTGTGCTTAAATTCATTAAGTTGTCGCAT---GATAAGATTAAAGGTCCT
19 GCTAAGCTTGAAATGGTGTGCTTACAAATTTGCTTAAATGTCGCT---GATAAGATTAAAGGTCCT

Consenso GCTG TGGAGAACGG GTGCT AC GT AC GT CC AAG T AGG AGA GC AAGGT AAG

1225

1296

1 TCCG**TCCAGATC**TCCGGCT-GA--TCA---CGATGATGCTGAT--CAGCAC---AGCACCAGCAGCA-GCTT
2 AGCAT**CGACATC**TCTGGAG-CC-TAAATT-TTCAAGATCTTCA--GGCCATC--ACGTCTTAAATTTGTTG
3 TCCAT**TGAGATC**TCTGGT-----TAAAA-TACAT-T-----T--GTGAA-----TTAAGTT---GATGTGTA
4 TCCAT**TGATATC**TCTGGTTAAGAGGA**ACTCTGAAGTTGGAAAGCTTAAGACA**--GTAATATGTGATAGTGTG
5 GCCAT**CGAGATC**TCCGGCTGAGTGCATGCGCTTTTTTCTACAA---AAATAT--CTGCTTAAAGAATAGAGTA
6 TCCAT**TGAGATC**TCTGGTTAAAAATACATTTGTTAATTAAGT**TGATGTGATGGTCAAATAATACTGAGTT**
7 GCCAT**CGAGATC**TCCGGCTGACTGCATGCGTTTGGACG--TAT--GC----TCATT**CAGTTGGAGCCAATT**
8 ACCAT**CGAGGTA**ACTATGGGAAATCA**GTA**-GGATCACACCGT**TAGGGCTCTC**--TTGAAATGACACTGACAA
9 ACCAT**CGAGGTC**AAGGTCGCGTGATG**ATTCCGCATCTCTCTG**-CATCTG-----CGTCGCTGCGTGGA
10 ACGAT**TGCAGTCC**AAATTG-GAT-AAATC-CTCCGCTG**TGTAT**--G-CAGG-----GATT--GAAATCTT
11 ACTG**TTCAAATC**GCTGTTT--CTTG**AGTA**-GTTTCTG**TGTTT**--TG-----TTTTTGTGTGTGT
12 AGTGT**TAAAGTTG**AGTAGA----ACAAC-CCAAG**CTG**-ATTT--GGCCAT-----TTTGCATCGACT
13 AACG**TCAAGGTTG**ATTAGA-----ATAGT-ATCACAT---TTT--GCTTCT-----TTTTCTTTGTACG
14 CAAG**TCAACGTC**GAGTAG-----
15 GACG**TGCAATCA**ACT-----AAA-AGTTGATGGTTT-----CG-----GTTTCTCTCTG-T
16 GACG**TGCAGTCC**CAGTAGA----CGAAT-GGCTGCTACTACT--ACTGAA-----CGTCACTCTGG-A
17 GACG**TGCAGGTC**CAGT-GA----TGAGT-TCGTG---TGAG--ACTGTA-----CCCTGCATCTG--A
18 AGA**TGGTTAGT**TATTGTGG--A--AGAGGATGACAAACCATCT-----AAGATCGTCAATGATG
19 AAAG**TGTGCT**ATTGAGAGTAAACA**CA**CAAGGAAAAGAGTCTCTGTTAGAG--AAGAGCTTAAATTTTATG

Consenso CCAT GAGATC A AA T T T T T
HRL

1297

1368

1 TGCTTCTC-TCTTCTCT-CCTTCTCTCTTCCAGAACGA**TAAATCTTC**--TAGGTCTC**ATC**-TAC
2 CGGTAAT--TTCAAATAA-GCTTGTGTGGTGTGTT--CACTGTTTTG**TATGTTG**--TAGTTCCTT**GTG**-GTG
3 TGGT-----CAAATA---CTG**AGTT**-GT**TGTT**--CTGT**TGAAGTTGAAG**--TTGCTCTGTTT-TTC
4 AAATAAAT--GGTCCGACTTTCCTTCTTCTTCTTCTGTAAT**CACCAATCT**CGTGTATCAATATAAGTAAT
5 AGAAA**ACTGTGC**ACGAAGAATATAG**GTACGAAGGTC**--TGAAAT**TGGTGTATCGATGAGCTGAATGTGAC**
6 TGT**TGTG**TCCGTTGAAGATTTGAAGTTGCTCTGTTTCT**TATCGAAGTCTTGAGT**CGGCTTTGCTTCTCGCC
7 TGGTTGATGTGTGTGCGAGT**CTTGCAGTCTGA**-----TGAGAC**TCTCTGAT**--TGTGTTCTTTCCCC
8 CGTACAGG--GGTTGAAATGCCAGAGTGT**CATGGTAGGATTTGTGCGAACGGTCTG**AACCATGAT**TGGAT**
9 TCAAAGAA-TCGAAGCTT**GAGTTGAGT**GAGT**TGTGAC**-TAGT**AGTAGAGT**AGAGT**TTCATCTTTAT**CGTT
10 TGGTGAA----TTTTGCAGGGTCTT**GTG**CC**TGTACC**-T**ATCTAGATTTG**CACG**ATTTACTTCCA**-GAC
11 TGT**TTTCT**-AGTTTGAATTTTT**CTGTGTTTGGATA**AAAA**AGCTCTGTTCT**-----TTTTATGTTTCTCT
12 A-CTCT---TTAGTTT-T-CTTT**ATTAGTGG**-----TGAT**GAATCTAG**-----TTAGTAGATAT----
13 AGCTCT---TGAAT---CT-----AG**ATCT**-----TGAT**GGA**TCTGGA-----TTTGAAC**CTT**----
14 -----
15 TG-TTTT---TTTGAAC--AT**TCTGTAAA**-T**GTAA**C-TGGCG**CAATAT**T-----TATA-CGAGTA-T--
16 GGATGTG---AGCCTGTG--ACCGT**GAG**-GGT**TAA**G-CAGTGT**GAGGTTG**-----AAAAGT**CTG**-T--
17 GGCTTTA---AGATTCA--GCTGTCCGAG**TGTGCT**-CTT**TG**TAGAG**TGTG**-----CCGTTTCTC-C--
18 AGTTGAA---TAATTATGTG**ATTTGT**ACTCATAAAA-A**TG**AAAA**TGTTT**-----TTCAT**TGT**TATTT
19 AGTT**CATC**-CTCTGTTTCTGTT**CA**-T**CCCTGT**TTCT**CTCTGTGGTATG**T**GATG**AAAAAAAT**GTTAA**

Consenso G T T GT TGT TGT A T TG T T

1369

1440

1 TT-CG**TATCGTCT**CTCTCT-C---TGTGCGTCTGATCT**GAGT**--CTCTC--TTTAA**TCGTA**---GT**GTA**-
2 TG-TAAAA**GTAT**GTTTTT-T---CTG**TATGATGGGTGATGG**--CCTGT--CAT**TATGTTAATCTTAT**
3 TA-TCG**AAAGTCT**TGAGTC-----GGCTCTGTTTCTCACCTA--ATGGC--GT**ACTTGC**-----T**GTA**A
4 CGTAATA**AAAGAGT**GTTTTGATCC--ATTG**ATAGTACGAGCCAA**-CCATA-CGAAT**CTTTGA**ATA**AAAA**
5 CTGCTT**ATCTT**CAGGTTCACT---AAT**CATGGGTCTACGATGATCAATAC**CC**TAAATATCATTGTATAC**
6 TAATGGCGT**AGTTG**TACTTTTTCAAGTTT**GACGTTGAATATG**AAAAATTTGCTTTTT**ATTTTTTACTGTAA**
7 AGTGT**TTTCTGT**ACTTGTGTA---TCGGCT**AATCGCCA**CAGAT**TCGGCGATGA**ATA**ATGAGAAATAAA**
8 GAACTCTGGT**TAGTCCGAGGTA**--CTTGG**TATGCCACTGTAGT**-AGGCAGTGT**GAGTTACGACGTTGGA**
9 T---GCTAC**GTGAGA**ATGTGA---GGACATGGTGGTCT**GATG**-CCG**TATGCGATG**T**GATGATGGAT**
10 TT-GAG**AAATATA**ATGAT-C---TG**CAATATATCCA**ACCTG--ATGGCG**CATAAA**TAAAGG**TTGTCTAC**
11 TG-TCG**AAATTTT**GAAATTGA---AG**AAATAA**TAGGTT**TAG**--CC-----
12 ---AAC**AGCTT**AATAGT-A---TTG**TGCTGTGTTG**GTT---TTG**AACTTCAA**ACG**TATCTGTA**A
13 ---T**AACTTTTCT**TGT-A---AGG**ATGTA**ACTAC**GGTT**--A**ATTACATCTGTTT**TTTCT**CTTTAA**
14 -----
15 ---AG---T**TTTAGCTA**-A---AC**AAAAAAA**-----
16 ---ACTAGAGG**TTGT**---A---ATT**ACTCAGCGAACGAGC**--GAATGAAT**GGAATAATGCTAGTATGA**
17 ---A**ATCTT**TTGCGC-A---CTCG**TGTGCGAAAGCGG**--CCGCG**AATC**-----
18 GTGAAT**AAAGGA**TGTTACCTAT--GAT**ATGGT**TTT**GTG**TG-T**ATG**CAACT**AAAGAGT**GCTG**TAAAGG**
19 AT---A**AAATCGTAT**TTT**GAAATAA**---A**AAAAAAAAAAAAAAAAAAAA**-A-----

Consenso AA GT T T G T T A

1441

1512

1 ATGTGTAAGTGTGCTGCTA-CTTACTCGTTAGGGTCGGTTCGGTGCCTTCTTTCTCTGTCCATCGCATTTCGT
2 ATATCGGTATTAAGAGAG-AAGAATTTTCATTTTCATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-
3 AATTTTCATGTGAAAG-A-TGTAATAGTAGTGTGTGTAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA-
4 GTTTTGAAGTGTCAATTTCTCTAGTCCTAATAAGTTTTTAAGTGAAGGGACCTCAGTCTTG-----
5 CCTTTTACCATGACGTGATACACAACCTCTGTAATGTACAGTATTAAGAGATATCTTTGGTCCATCATA
6 AAAAAAAAAAAAAAAAAA-----
7 TTGTTCTGATTTTGAGTGCACAAAAAAGGAATT-----
8 TACTTGGCATTCGGCGGATCTAGAGGGATCGTTTGCCTACTGCCTAATGTATAGTTTTTTGGTGCCTAACAG
9 GGTTTGATGTTT-GGTAATGGAAATGGGGATGTTCTGCTGCTTATCTG-----
10 ATTCCTGTCATGTATCGAGCTTCTGTTAATGGTACAACAGAGCTCTGCATTTAAATATAACTTCTGTATTT
11 -----
12 TAATTGTTATATAGAGTTGTGAA-TGAGCTTGTGTTTAGAAGTCTACTGCAGTCTGAATTTGACTTGTCAA
13 AAAA-----
14 -----
15 -----
16 GATAAAAGGTTGGTTGCTCTC-----
17 -----
18 CTTGTTAATTCATAGTGAATAACTTGTGGCTTTTGT-----
19 -----

Consenso

T

1513

1584

1 CGAGCGATTCTCGTGCATTTTTGTATTTGAATGCTGGTGAATTACTGATGCGTGTCTTGGTCTGCTGTA
2 -----
3 -----
4 -----
5 CGTACAAGAGACCAGTGGCAATCTGGAGAATGAGAGGTCAAGTCAAGGGAACCTCTGATGGGTCTACGATGA
6 -----
7 -----
8 CAGAGGGCTCAGAACGCAATCGTGAATAAATAACCTGAGTATGTTTCGAGATAAATCTTTTAAATATTTCA
9 -----
10 GAAAGCTTTTACTGG-----
11 -----
12 TGAAATTCGTGTCATTTTAAATTCGT-----
13 -----
14 -----
15 -----
16 -----
17 -----
18 -----
19 -----

Consenso

1585

1639

1 TGCCGGGCCACTTTGCGTGTAATAAATCGTGTGAATCTTATCCT-----
2 -----
3 -----
4 -----
5 TCA-----
6 -----
7 -----
8 ACGGACGTTTCAATACAAATGTTATTTTGCCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
9 -----
10 -----
11 -----
12 -----
13 -----
14 -----
15 -----
16 -----
17 -----
18 -----
19 -----

Consenso

ANEXO II. Transformación de plantas de tabaco y Arabidopsis.

Las semillas de Arabidopsis y tabaco germinaron según el procedimiento descrito en materiales y métodos (apartado III.2.6.3.), la figura 1 muestra las plantas de tabaco y Arabidopsis después de un mes de crecimiento en el medio Gamborg's B-5.

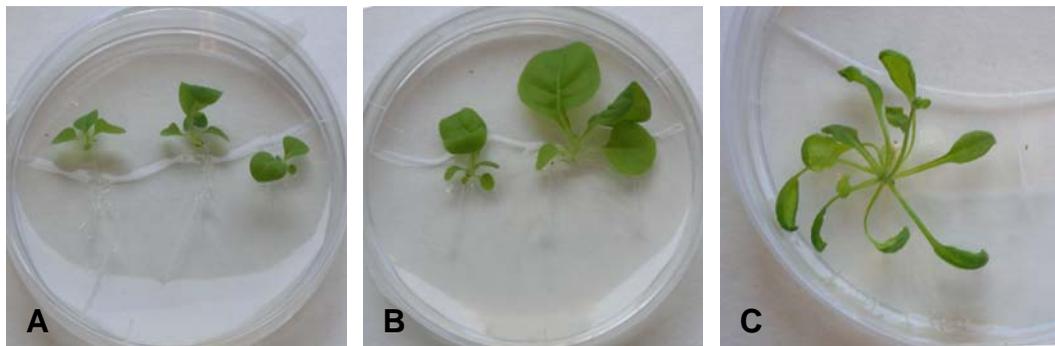


Figura 1. Germinación de semillas de tabaco (A y B) y de Arabidopsis (C) para la transformación.

Después de un mes y medio de crecimiento las plantas se transformaron con el gen de la sHSP de chirimoya y los explantos de hojas se incubaron en medio de regeneración (apartado III.2.6.4.). La mayor concentración de citoquininas (BA) que de auxinas (NAA) favorece la formación de tallos. En la figura 2 se observan explantos de hojas de tabaco tres semanas después de la transformación, en algunos ya se empieza a observar la aparición de los primeros brotes.

Cuando los brotes alcancen un tamaño de 10-20 mm, se pasarán a medio de enraizamiento y posteriormente a tierra. Tras comprobar que las plantas

contienen la construcción mediante PCR, se pasará a estudiar el efecto protector de la sHSP frente a distintos tipos de estrés.



Figura 2. Explantos de tabaco tras la transformación con *Agrobacterium*. Las fotos fueron tomadas tres semanas después de la transformación.