



universidad  
de león

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES



# **Mecanismos genéticos de tolerancia a altas temperaturas en plantas**

## **Genetic mechanisms of tolerance to high temperatures in plants**

Autor: María Baztán Borjabad

**GRADO EN BIOLOGÍA**

Julio 2020

## **Índice:**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1.- Resumen</b>   |           |
| <b>2.- Introducción</b>  | <b>1</b>  |
| <b>3.- Materiales y métodos</b>  | <b>3</b>  |
| <b>3.1.- Diseño</b>  | <b>3</b>  |
| <b>3.2.- Estrategia de Búsqueda</b>  | <b>3</b>  |
| <b>3.3.- Criterios de inclusión y exclusión</b>                              | <b>4</b>  |
| <b>3.4.- Extracción de datos</b>   | <b>4</b>  |
| <b>4.- La señal del estrés</b>   | <b>5</b>  |
| <b>5.- Conceptos básicos</b>   | <b>6</b>  |
| <b>6.- Mecanismos de tolerancia a nivel fisiológico</b>                      | <b>7</b>  |
| <b>6.1.- Desarrollo foliar y alteraciones en la maquinaria fotosintética</b> | <b>7</b>  |
| <b>6.2.- Fotorrespiración en plantas de interés agronómico C3 y C4</b>       | <b>9</b>  |
| <b>7.- Mecanismos de tolerancia a nivel molecular</b>                        | <b>10</b> |
| <b>7.1.- Producción de especies reactivas de oxígeno</b>                     | <b>11</b> |
| <b>7.2.- Integridad de la membrana plasmática</b>                            | <b>11</b> |
| <b>7.3.- Alteración de los niveles de calcio</b>                             | <b>12</b> |
| <b>7.4.- Acumulación de osmolitos compatibles</b>                            | <b>13</b> |
| <b>7.5.- Hormonas</b>  | <b>14</b> |
| <b>8.-Proteínas de choque térmico (HSPs)</b>                                 | <b>16</b> |
| <b>8.1.- Diversidad de proteínas de choque térmico</b>                       | <b>17</b> |
| <b>8.2.- Promotores de choque térmico</b>                                    | <b>19</b> |
| <b>9.- Diversidad de factores de transcripción frente al estrés abiótico</b> | <b>19</b> |
| <b>9.1.- Factores de transcripción</b>                                       | <b>19</b> |
| <b>9.2.- Regulación</b>  | <b>20</b> |
| <b>9.2.- Factores de transcripción HFA1, HFA2, HFA3</b>                      | <b>22</b> |
| <b>9.3.- Factores de transcripción WRYK</b>                                  | <b>23</b> |
| <b>10.- Mejora genética</b>  | <b>23</b> |
| <b>11.- Conclusiones</b>   | <b>25</b> |
| <b>12.- Referencias</b>  | <b>26</b> |

## **1.-Resumen**

Esta revisión tiene como objetivo conocer cuales son los mecanismos moleculares y fisiológicos que subyacen tras el estrés abiótico provocado por el aumento de las temperaturas, para conseguir nuevas variedades de plantas termotolerantes. Para ello se ha empleado una metodología de revisión y lectura de documentos académicos, empleando las principales herramientas de búsqueda científica, usando criterios de inclusión y exclusión y finalmente extrayendo la información. El aumento de las temperaturas no es un problema aislado fruto del cambio climático, por lo que es muy difícil predecir cuales son los mecanismos clave de adaptación. Podemos afirmar que los genes codificantes de proteínas de choque térmico junto con sus factores de transcripción, las hormonas, las especies reactivas de oxígeno, los canales de calcio, la membrana plasmática y los distintos cambios en la estructura de la planta a nivel foliar, radicular o estomático son clave para la supervivencia de la planta frente a elevadas temperaturas. Aumentar los conocimientos actuales sobre los mecanismos genéticos y fisiológicos de tolerancia a las altas temperaturas es clave para conseguir desarrollar variantes termotolerantes. En esta revisión se resumen las últimas aportaciones científicas sobre las bases genéticas de tolerancia al estrés causado por altas temperaturas.

## **1.-Abstract**

The objective of this review is to find out what are the molecular and physiological mechanisms underlying the abiotic stress caused by the increase in temperatures, in order to obtain thermotolerant plants. For this, a methodology of synthesis, review and reading of academic documents has been used, using the main scientific search engines, using exhaustive inclusion and exclusion criteria and finally extracting the information. The increase in temperatures is not an isolated problem due to the global warming, making it very difficult to predict which are the key mechanisms in the whole plant. We can affirm that the heat shock proteins together with their transcription factors, hormones, reactive oxygen species, calcium channels, the plasma membrane and the various changes in the structure of the physiological plant at leaf, root or stomatal level they are key to the survival of the plant against high temperatures. To increase the current knowledge on the genetic and physiological mechanisms of tolerance to high temperatures is a critical step in order to develop thermotolerant variants,. The final goal of this review is to summarize the state of art in the current knowledge about the genetic bases of plant tolerance to high-temperature stress.

## **Palabras clave:**

Aclimatación, chaperona, factor de transcripción, fotorrespiración, termotolerancia y proteína de choque térmico.

## **Keywords:**

Acclimatization, chaperone, compatible osmolyte, heat shock protein y photorespiration transcription factor.

## **2.- Introducción**

Las plantas son organismos sésiles por lo que son incapaces de huir de situaciones de estrés, moviéndose de un lugar a otro. A pesar de ello han colonizado prácticamente la totalidad de los hábitats terrestres, esto puede ser el resultado de su alta capacidad de respuesta o adaptación, dando el fenómeno conocido como aclimatación. La producción agronómica a gran escala es uno de los hitos más importantes de nuestra era, los investigadores tendrán que hacer frente a los nuevos desafíos consecuencia del cambio climático, como el aumento de las temperaturas, la fluctuación de las concentraciones de dióxido de carbono, el aumento del nivel del mar, la disminución de los glaciares o los cambios en los patrones de precipitación, entre otros. Debemos destacar especialmente los cambios en los eventos climáticos extremos como las sequías, inundaciones o estrés por calor, entre los factores asociados al fenómeno del cambio climático. Los modelos climáticos pronostican que la temperatura de la tierra aumentará entre 1 y 4 °C (IPCC 2014). Las consecuencias no serán iguales en los distintos continentes, las regiones más afectadas se cree que serán las que mayor inseguridad alimentaria tienen actualmente, que son África y Asia.

En lo que se refiere a la región mediterránea tampoco está exenta de problemas asociados al cambio climático. La producción a gran escala se centra en unos pocos países, presentando la gran mayoría un déficit productivo, asociado a una producción insuficiente de alimentos básicos. Esta dependencia externa supone un problema, ya que los modelos de predicción prevén una limitación de recursos naturales valiosos como el agua. Los efectos del cambio climático sobre el rendimiento de los cultivos serán variables y dependerán de diversos factores como la disponibilidad de nutrientes, agua dulce, materia orgánica, textura del suelo, cambios en los patrones de precipitación, propagación de plagas y enfermedades en los cultivos. Aún se está a tiempo de intentar paliar algunos de estos efectos provocados por el cambio climático, cambiando las actividades antropogénicas más agresivas que realizamos de forma cotidiana, como la quema de combustibles fósiles, la deforestación y la emisión de gases de efecto invernadero. En Estados Unidos en los últimos años la duración de la temporada de crecimiento, conocida por ser el periodo en el que se pueden cultivar las plantas debido a las condiciones

climáticas, ha aumentado y se espera que siga aumentando en los años venideros, pudiendo tener beneficios para los agricultores porque permitiría diversificar los cultivos u obtener múltiples cosechas de uno mismo. Pero este fenómeno puede ser un arma de doble filo al favorecer la aparición de plagas, maleza, especies invasoras o un aumento de la demanda de riego. La disponibilidad de agua es un problema incipiente que lleva manifestándose en la última década y hay que tener en cuenta que la agricultura representa el 70 % de las extracciones mundiales de agua dulce en todo el mundo (Hoekstra *et al.*, 2012). El riego que se emplea en los cultivos procede de dos fuentes, por un lado de las fuentes renovables que consisten en aguas subterráneas o superficiales que se renuevan anualmente y por otro lado de las fuentes no renovables, como los depósitos de agua subterránea cuya tasa de recarga es inferior a la tasa de consumo. En el año 2012 se estimó que casi el 20 % de la demanda mundial de riego se cubrió mediante la extracción de aguas subterráneas no renovables (Wada *et al.*, 2012). Esto supone un problema ya que de continuar así a largo plazo, no se podrá mantener la producción de alimentos suficiente en ciertas regiones.

En esta revisión nos centraremos en cómo incide sobre las plantas la variable temperatura, ya que es un condicionante esencial de procesos importantes para las plantas, como las reacciones químicas catalizadas enzimáticamente, la viscosidad o fluidez de la membrana, la estructura del citoesqueleto y la actividad de las macromoléculas esenciales junto con su estado físico entre otros (Ruelland y Zachowski., 2010). Algunos estudios informan que el aumento de temperatura en tan solo 1 °C resulta en una disminución del rendimiento de 4 a 10 % (Grover *et al.*, 2013), otros autores hablan de pérdidas de 5,5 % y el 3,8 % en los rendimientos mundiales de trigo y maíz, respectivamente (Lobell *et al.*, 2011). Por lo que podemos afirmar que el aumento de las temperaturas es una causa importante de la pérdida de rendimiento en los cultivos. Para resolver esta cuestión, el desarrollo de nuevas variantes tolerantes a altas temperaturas es una gran estrategia para combatir estos efectos negativos. Sin embargo, este proceso implica una mejora en el conocimiento actual de los mecanismos fisiológicos y las bases genéticas de tolerancia. A pesar de que en los últimos años se han realizado importantes avances en los mecanismos moleculares de la respuesta al estrés por altas temperaturas y en la identificación de genes o loci de rasgos cuantitativos (QTL) asociados con la tolerancia al calor en las plantas, aún queda mucho camino por

recorrer. Algunos de los mecanismos que usan las plantas para contrarrestar los efectos del estrés por calor en el metabolismo celular son la reprogramación de su transcriptoma, cambios en la membrana plasmática, alteraciones de las chaperonas moleculares todo ello acompañado de la producción de *novo* de proteínas, metabolitos, lípidos y osmolitos. La comprensión de los mecanismos genéticos que usan las plantas para adaptarse y soportar el aumento de la temperatura es de vital importancia para los investigadores, de esta forma producir plantas termotolerantes no será un logro exclusivo de invernaderos y laboratorios sino que se podrán producir en campo en cultivos a gran escala. Para lograrlo, una aproximación prometedora consiste en la identificación de genes candidatos mediante la comparación de su nivel de expresión génica a diferentes temperaturas. De este modo pretendemos comprender mejor el proceso de respuesta a este tipo de estrés en los principales grupos de plantas cultivables y poder utilizar esta información para el desarrollo de nuevas variedades mejor adaptadas a estas condiciones ambientales.

### **3.- Materiales y métodos**

#### **3.1.- Diseño**

En el trabajo que aquí se presenta se ha realizado una revisión sistemática de los artículos publicados en revistas científicas y documentos de sociedades científicas, en la que se enfatiza en los cambios fisiológicos y moleculares que aparecen en las plantas como respuesta al aumento de las temperaturas y que les permite aumentar su supervivencia.

#### **3.2.- Estrategia de búsqueda**

La estrategia de búsqueda de la información fue la siguiente: en primer lugar se seleccionaron los motores de búsqueda en este caso los empleados fueron “Web of Science, Pubmed y Google Scholar”. La búsqueda de la información se llevó a cabo en los meses de enero, febrero y marzo de 2020. El buscador más utilizado y del que más artículos e información relevante se extrajo fue el motor de búsqueda de “Web of Science”. En lo que se refiere a este motor de búsqueda se utilizó la colección principal como base de datos. Las búsquedas no se limitaron por año de publicación aunque en primera instancia sí se introdujo la variable de no ser anterior al año 2000, a pesar de que finalmente sí se han empleado algunos artículos relevantes anteriores a este período. El idioma de los estudios consultados era principalmente

inglés pero también seleccionamos alguna búsqueda en español. Se analizaron además las referencias bibliográficas de los artículos encontrados y seleccionados con el fin de encontrar otros estudios potencialmente interesantes para esta revisión. Las palabras clave que se introdujeron en la búsqueda básica fueron *heat shock genes*, *heat shock genes plants*, *heat shock genes high temperatures*, *heat stress plants*, *hsp70*. Los resultados obtenidos en esta primera búsqueda eran demasiado amplios ya que oscilaban entre los 30.000 y los 2.000 resultados. Por lo que para poder trabajar con esta información refinamos la búsqueda con la opción de seleccionar el “tipo de documento” introduciendo aquí documento tipo revisión. Del mismo modo se emplearon palabras clave adicionales para refinar aun más la búsqueda siendo estas *genome*, *plants*, *hsp*, *identification* y *LMW-HSPs*, se utilizaron todas las combinaciones posibles buscando optimizar la búsqueda, después de ello los resultados obtenidos ya era manejables y oscilaban entre 200 y 20 artículos todo ellos de revisión. El tipo de documento fue un condicionante decisivo, puesto que la información que este tipo de documento nos brinda es mucho más interesante por su carácter informativo ya que nuestro estudio al centrarse en cómo afecta el estrés abiótico del aumento de las temperaturas en las plantas es un tema de alto carácter multidisciplinar.

### **3.3.- Criterios de inclusión y exclusión**

Los criterios de inclusión y exclusión para su uso o no en este trabajo fueron en primer lugar revisar el año de publicación, la finalidad del estudio, las fuentes de información, revista o lugar de publicación, si los resultados obtenidos eran informativos o no, cuáles son las conclusiones del estudio, si se trata de estudios específicos de una especie vegetal concreta o estudios más generales del conjunto de plantas y cuál es el tipo de estudios revisados; ensayos, estudios observaciones o modelos de simulación. Después de este primer filtro de selección, los criterios que se impusieron para continuar con el proceso selectivo fue proceder a la lectura de los resúmenes y por último se realizó la lectura completa de los trabajos seleccionados.

### **3.4.- Extracción de datos**

Se han localizado 100 estudios potenciales, pero se han excluido 73 que no aportaron información suficiente para el objetivo de esta revisión o bien porque eran demasiado

específicos o no cumplían con alguno de los criterios de inclusión fijados previamente. Los estudios finalmente seleccionados fueron 27, la mayoría de ellos artículos de revisión a pesar de haber algún otro tipo de artículo. Los estudios seleccionados no son específicos de una única especie de planta, sino que tienen un carácter más generalizado. Los estudios seleccionados comprenden el periodo 2007 a 2019. Finalmente tras el uso de estos 27 estudios se revisaron sus referencias bibliográficas y citas, encontrado así otros estudios de potencial interés que también han sido incluidos en esta revisión, siendo el número final de artículos empleados 83.

La presente revisión analiza algunos de los aspectos más importantes sobre los mecanismos genéticos y fisiológicos de tolerancia a las altas temperaturas en plantas.

#### **4.- La señal del estrés**

El estrés por altas temperaturas en plantas se define como el aumento de temperatura en un tiempo suficiente como para causar daños irreversibles (Kimberlayn *et al.*, 2018). A pesar de la capacidad de las plantas de ajustarse a la fluctuación de la temperatura, la exposición prolongada a una temperatura por encima de un determinado umbral puede causar daños irreversibles en su crecimiento y productividad. Las temperaturas superiores al nivel óptimo de entre 10 y 15 °C se conoce como estrés por calor. La respuesta al estrés por altas temperaturas es un proceso complejo y multifactorial, con el fin de mantener la homeostasis celular. Cada especie tiene una temperatura óptima, máxima y mínima para su desarrollo, cuando la temperatura excede o baja esos límites, el crecimiento y el rendimiento de los cultivos se ven afectados. El umbral del estrés se determina cuando hay una gran reducción en el desarrollo y crecimiento de plantas o cuando se ve gravemente afectado algún proceso vital; ante ese estrés la planta iniciará los mecanismos necesarios que le permitan garantizar su supervivencia. Las plantas para contrarrestar los efectos negativos del aumento de temperatura responden reprogramando su maquinaria genética (Grover *et al.*, 2013). Todo ello implica tanto la síntesis de chaperonas moleculares, como de productos involucrados en la señalización del calcio, fosforilación de proteínas, fitohormonas, metabolismo de azúcares y lípidos, conceptos que iremos abordando a lo largo de esta revisión.

## **5.- Conceptos básicos**

### **-Aclimatación**

La aclimatación consiste en la modificación del metabolismo para evitar el daño causado por el cambio ambiental al que está sometido un organismo (Mittler *et al.*, 2012). Estos cambios metabólicos son consecuencia de la plasticidad fenotípica y son reversibles ya que no implican cambios a nivel genético.

### **- Termotolerancia**

La termotolerancia es la capacidad de un organismo para reducir la susceptibilidad al choque térmico y de esta manera poder adaptarse al aumento de las temperaturas. Las plantas según sus niveles de tolerancia a altas temperaturas se pueden clasificar en tres categorías: sensibles al calor, relativamente tolerantes al calor y tolerantes al calor. A pesar de distinguir estas tres categorías una exposición a temperaturas muy elevadas provoca serios daños en la planta a nivel celular en un periodo de tiempo muy corto, en cambio, la exposición a temperaturas más moderadas debe de ser más prolongada en el tiempo para generar este mismo efecto. Se distingue dos tipos de termotolerancia:

#### **-Termotolerancia basal**

Es la capacidad inherente de la planta de sobrevivir a temperaturas por encima de la temperatura óptima de crecimiento sin necesidad de aclimatarse al calor o de ser sometidas a algún tratamiento previo, se produce como consecuencia de un aumento brusco de la temperatura.

#### **-Termotolerancia adquirida**

Se define como la capacidad de adquirir tolerancia a temperaturas letales; para ello se somete a las plantas a un tratamiento de estrés suave por calor, de esta manera se consigue que adquieran una tolerancia transitoria frente a temperaturas más elevadas. La termotolerancia adquirida se logra gracias a la aclimatación. Este tratamiento tiene un mayor porcentaje de supervivencia de plántulas que la termotolerancia basal y se trata de un proceso lento y continuado, se induce la síntesis de proteínas de choque térmico que en su mayoría actúan como chaperonas moleculares (Singh *et al.*, 2019). En particular, la chaperona Hsp100 / ClpB, Hsp101 es necesaria para la aclimatación al calor en plantas (Hong y Vierling 2000).

## **- Adaptación**

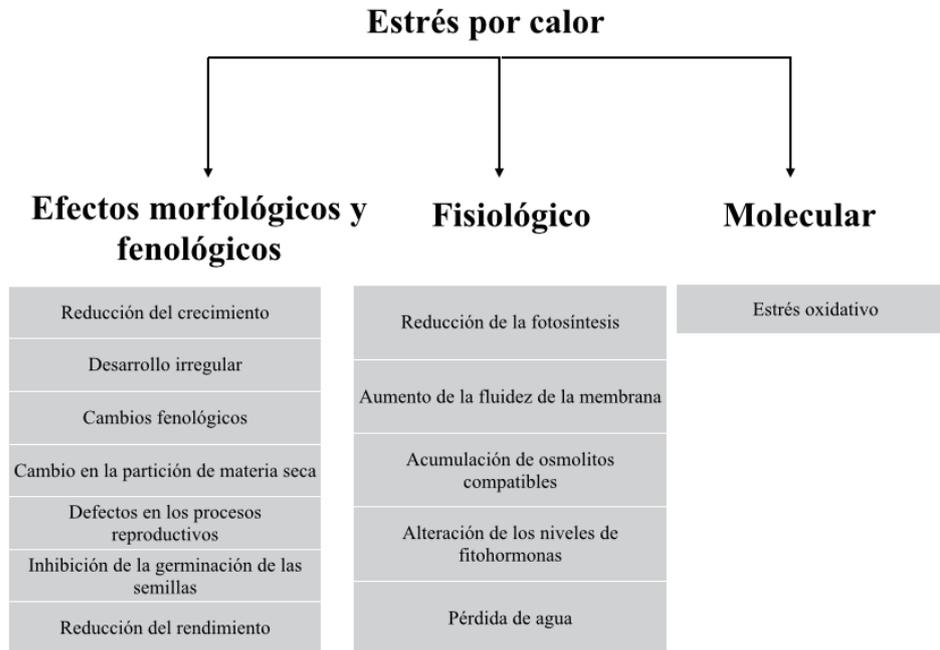
Pero no todos los mecanismos que emplean las plantas para mejorar su supervivencia frente al aumento de las temperaturas son los descritos anteriormente. Las plantas en vez de modificar su metabolismo, pueden presentar modificaciones genéticas no reversibles y transmitibles a la descendencia, produciéndose una adaptación.

### **6.- Mecanismos de tolerancia al estrés por calor a nivel fisiológico**

En respuesta al estrés por calor, las plantas manifiestan diferentes adaptaciones morfológicas. Ante la alta exposición solar es importante diferenciar entre plantas de sol y las plantas de sombra ya que tendrán distinta tasa de asimilación fotosintética y su reacción ante este estrés no será por tanto la misma. A nivel de planta hay una tendencia generalizada a reducir el tamaño de la célula, cerrar los estomas y disminuir la pérdida de agua (Pirasteh-Anosheh *et al.*, 2016), también a cambiar la orientación de la hoja, aumentar la refrigeración y la transpiración e inhibición de la fotosíntesis (Wahid *et al.*, 2007). Otros cambios comúnmente dados ante este estrés son el aumento de la pubescencia de la hoja (Zhang *et al.*, 2009) e incluso los eventos prolongados de exposición solar pueden provocar la aparición de quemaduras en la misma (Doyle *et al.*, 2010). No es raro que se produzcan modificaciones en la arquitectura de la planta, produciéndose un alargamiento de los hipocotilos y pecíolos (Hua *et al.*, 2009). En lo que se refiere a los órganos subterráneos de las plantas, estos son considerablemente sensibles y se provoca en ellos una inhibición de su crecimiento. Pero el efecto más destacado con este estrés es la modificación de la tasa de crecimiento, produciéndose cambios en el peso y el tamaño total de la planta, reduciéndose significativamente tanto el crecimiento foliar, como generalizado a nivel de planta. En lo que se refiere a la etapa reproductiva de las plantas, esta es extremadamente sensible a las altas temperaturas, durante ella no es infrecuente que se produzcan abortos significativos de los botones florales, pérdida de brotes, frutas o semillas (Doyle *et al.*, 2010).

#### **6.1.- Desarrollo foliar y alteraciones en la maquinaria fotosintética**

La hoja es el órgano especializado en la fotosíntesis, en ella encontramos a los plastidios especializados de doble membrana encargados de ejecutarla: los cloroplastos. Los cloroplastos tienen su propio genoma y su propia maquinaria de síntesis de *nov*o de proteínas.



**Figura 1.** Efectos del estrés por calor en la fisiología de las plantas a nivel morfológico, fisiológico y molecular (modificado de Hemmati *et al.*, 2015).

La fotosíntesis se encuentra entre las funciones celulares de la planta más sensibles al estrés por altas temperaturas (Mathur *et al.*, 2014) por lo que se ve fuertemente afectada con el aumento de las temperaturas. El desajuste en el sistema fotosintético es debido a una excitación excesiva de los fotosistemas, estos son elementos clave, ya que son los encargados de obtener la energía útil y poder reductor. Existen dos fotosistemas, el fotosistema I (PSI) conocido por ser más termoestable y el fotosistema II (PSII) que es más sensible debido a su localización en las láminas de los tilacoides de los cloroplastos. Otro concepto a tener en cuenta en el proceso fotosintético es la importancia de la enzima Rubisco, también conocida como ribulosa 1,5 bifosfato carboxilasa/oxigenasa. Esta enzima tiene una función muy importante durante el proceso fotosintético ya que es la enzima que cataliza la fijación de dióxido de carbono a una molécula orgánica, para así poder comenzar el ciclo de Calvin, gracias a su función carboxilasa. Se ha visto que el estrés por calor afecta a esta enzima tan importante, reduciendo su actividad, como resultado de una desnaturalización y de una pérdida de activación (Grover *et al.*, 2013), consecuentemente se produce un descenso en el balance de carbonos (Barrantes *et al.*, 2017). Además de todo este proceso fotosintético, las

plantas tienen que enfrentarse al problema que supone la fotorrespiración, esta se intensifica con el aumento de las temperaturas como se verá en el siguiente apartado.

## **6.2- Fotorrespiración en plantas de interés agronómico C3 y C4**

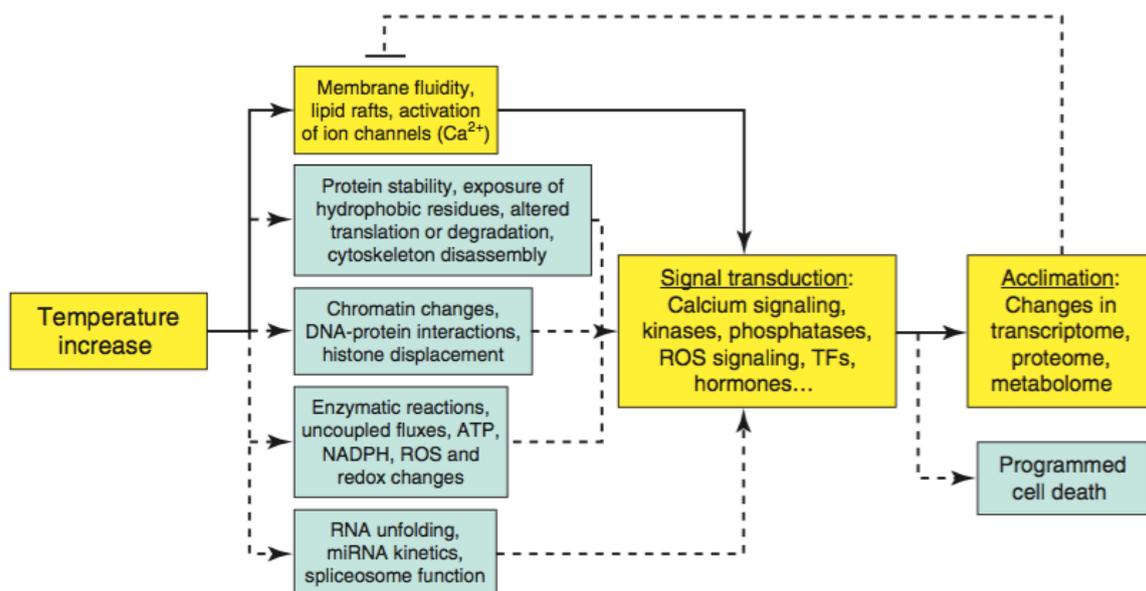
La fotorrespiración consiste en un proceso realizado por las plantas en el que se consume oxígeno ( $O_2$ ) y se produce dióxido de carbono ( $CO_2$ ), este proceso se activa por la luz y se produce por la poca especificidad de la Rubisco y su actividad oxigenasa. Esta actividad provoca que el oxígeno compita con el dióxido de carbono por el centro activo de la enzima. Es una reacción muy costosa para la célula energéticamente hablando, ya que como consecuencia se forma un metabolito secundario de nula utilidad metabólica, el 2-fosfoglicerato. Para paliar los efectos de la fotorrespiración que ocurren durante el ciclo de Calvin, las plantas intentan minimizar al máximo la pérdida energética, por ello en la naturaleza se diferencian tres grandes grupos de plantas. Cada uno de estos grupos de plantas responderán de una manera distinta al aumento de las temperaturas y son plantas con metabolismo C3, C4 y CAM. La respuesta al aumento de la temperatura no dependerá solo del genotipo o de su capacidad de aclimatación, adaptación o termotolerancia, sino que el tipo de metabolismo que tenga la planta jugará un papel importante. El impacto de las altas temperaturas en la actividad fotosintética es mayor en las plantas C3 que en las plantas C4. El tipo metabólico será por tanto un factor determinante en los cultivos. A continuación se comentan estos dos grandes grupos, ya que son los que tienen un interés agronómico.

La mayoría de plantas presentan un metabolismo C3, algunos ejemplos de ellas son el trigo, el arroz o la soja. La diferencia entre estos dos grandes grupos, plantas C3 y C4, estriba en la manera en la que realizan la fotorrespiración. Por un lado en lo que se refiere a las plantas con metabolismo C3 su rendimiento neto es de una molécula de gliceraldehído 3 fosfato (GA3P) por cada 3 moléculas de dióxido de carbono asimiladas, todo ello acontece en una única localización, las células del mesófilo, formándose como consecuencia de la actividad oxigenasa de la rubisco el metabolito de nula utilidad metabólica que supone un gasto energético recuperar sus carbonos. Por otro lado en lo que se refiere a plantas C4, la fijación del dióxido de carbono y la actividad de la Rubisco se produce en células separadas, lo que evita la fotorrespiración. La fijación del  $CO_2$  se produce en las células de mesófilo y se

forman productos intermedios como el oxalacetato o el malato a partir de productos de 4 carbonos. Posteriormente el malato pasa a las células de la vaina del haz por los plasmodesmos, descarboxilándose, perdiéndose así una molécula de CO<sub>2</sub> que irá al ciclo de Calvin, que también se acontece en la vaina del haz. Todo esto sirve para evitar la fotorrespiración y el coste añadido de recuperar el fosfoglicolato. La disposición natural de las plantas C<sub>4</sub> está comúnmente asociada a zonas con latitudes más calurosas y a climas tropicales, ya que su metabolismo se considera una adaptación al aumento de las temperaturas, algunos ejemplos de estas plantas son el maíz, el sorgo y la caña de azúcar.

### 7.- Mecanismos de tolerancia a nivel molecular

El trabajo genómico y proteómico revela que la respuesta a altas temperaturas se caracteriza por la rápida reprogramación de la maquinaria de expresión génica que conduce a la inducción y represión de miles de genes a los pocos minutos de la exposición al estrés por alta temperatura (Mittal *et al.*, 2012). En general la mayoría de genes sensibles al estrés por calor están involucrados en el metabolismo primario y secundario, traducción, transcripción y regulación (Takahashi y Shinozaki, 2019).



**Figura 2.** Modelo esquemático sobre como el aumento de temperatura produce cambios a nivel molecular en las plantas, cambios en la fluidez de membrana, canales de calcio, transducción de señales, estabilidad proteica, acumulación de especies reactivas de oxígeno (Mittler *et al.*, 2012).

### **7.1. Producción de especies reactivas de oxígeno**

Debido a que la mayoría de las reacciones celulares están acopladas, la interrupción del flujo de metabolitos puede causar la acumulación de subproductos tóxicos, como las especies reactivas de oxígeno también conocidas como ROS. La aparición repentina de esta toxicidad puede alterar gravemente la homeostasis celular (Mittler *et al.*, 2004). La generación de estas ROS puede ocurrir en zonas concretas de la planta como en los peroxisomas, las mitocondrias y cloroplastos, pero también es común que aparezca en los centros de reacción de los fotosistemas I y II (Sharma *et al.*, 2012). Algunos ejemplos de ROS de elevada toxicidad son los radicales superóxido e hidroxilo y el peróxido de hidrógeno. Los radicales superóxido se forman en muchas reacciones algunas de ellas como la fotooxidación en cloroplastos o en las reacciones en cadena de transporte de electrones en mitocondrias. En lo que se refiere a toxicidad, esta es mucho mayor en los radicales hidroxilo pudiendo dañar moléculas esenciales (Hemmati *et al.*, 2015). Esta toxicidad puede ser eliminada por enzimas detoxificadoras como las superóxido dismutasas (SOD), glutatión peroxidasa, ascorbato, catalasas (CAT) y peroxidasas (Mittler *et al.*, 2012) debido a que se produce una mayor expresión de estas enzimas en situaciones de acumulación de ROS y se consideran la primera defensa empleada por las plantas para combatir esta toxicidad. Las ROS son moléculas muy reactivas que provocan daño oxidativo en las biomoléculas como el DNA, proteínas, lípidos y carbohidratos, además de desequilibrios entre los procesos respiratorios y fotosintético.

### **7.2.- Integridad de la membrana plasmática**

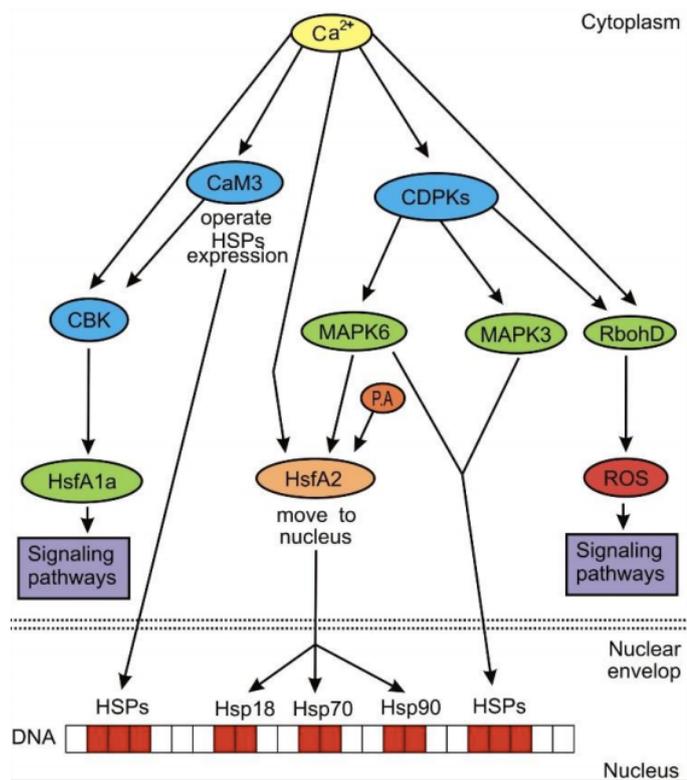
La membrana plasmática es el primer componente físico que entra en contacto directo con las altas temperaturas, es la primera barrera de protección frente a este estrés. Como respuesta a el aumento de las temperaturas se provocan en ella la apertura de canales de calcio, produciéndose un aumento de los niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Wu *et al.*, 2010). El calor modifica las propiedades físicas de esta membrana a nivel de organización estructural y es común la pérdida de integridad de membrana y de la bicapa lipídica (Saidi *et al.*, 2011). La desnaturalización proteica causada por el aumento de las temperaturas modifica el número de ácido grasos insaturados, alterándose la composición lipídica normal y aumentándose la fluidez de la membrana. Estos cambios en la bicapa lipídica y fluidez de la misma se consideran una adaptación de las plantas para combatir el estrés por calor (Savchenko *et al.*,

2002). Ya que el aumento de la fluidez de la membrana activa las cascadas de señalización basadas en lípidos, aumento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  y la reorganización del citoesqueleto, señalización que dará como resultado la producción de osmolitos y varios antioxidantes en respuesta a altas temperaturas (Bita y Gerats 2013). Pero no todos los cambios que suceden en la membrana plasmática de la planta son adaptativos, ya que las modificaciones en las estructuras terciarias y cuaternarias de las proteínas aumentan la permeabilidad de la membrana lo que supone un aumento de la fuga de electrolitos celulares que puede provocar graves problemas osmóticos e intensos desbalances hídricos, por lo que el aumento de las temperaturas puede tener unas consecuencias drásticas e irreversibles para la planta.

### **7.3.- Alteración de los niveles de calcio**

Otro de los mecanismos de adaptación molecular al estrés por calor es el papel del calcio en la señalización celular. El calcio entra por los canales presentes en la membrana plasmática aumentando los niveles de calcio intracelular y provocando que se fosforilen las proteínas y que se activen varios factores transcripcionales de estrés por calor (Saidi *et al.*, 2011). Wu *et al.* (2010), mostró en sus experimentos que se produce una afluencia transitoria de calcio en varias plantas a los pocos minutos del aumento de la temperatura, estos aumentos tienen un papel importante en la termotolerancia de las plantas y conducen a una reorganización citoesquelética. Estudios recientes como el de Sajid *et al.* (2018), informan de la importancia del calcio en la regulación de las actividades de los factores de transcripción de choque térmico (HSF), ROS, y las proteínas de choque térmico (HSP) que tan importantes son para la planta en la adquisición de la termotolerancia. Por tanto los iones calcio tienen un papel muy importante en la respuesta frente al estrés por calor y activa las señales correspondientes a través de una cascada de señalización. Los canales de calcio muestran un dominio carboxilo terminal citosólico de unión a calmodulina. La calmodulina (CaM) es una proteína termoestable que tiene un papel importante en la regulación proteica, está involucrada en la activación de factores de transcripción importantes como los factores WRKY. La calmodulina también activa la proteína quinasa de unión al calcio (CBK) y es necesaria para la señalización de estrés por calor (Zhang *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2010; Mittle *et al.*, 2012). Por otro lado la CDPK es una proteína quinasa dependiente de calcio que está altamente relacionada con la expresión de proteínas de choque térmico y que también controla la

acumulación de ROS (Sajid *et al.*, 2018). Esta quinasa también puede activar la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) o la enzima NADPH oxidasa productora de ROS. Las vías de señalización de MAPK están altamente conservadas y participan en respuestas a señales externas y diferentes estreses abióticos (Danquah *et al.*, 2014). Las CAM y MAP quinasas específicas se asocian a eventos posteriores que transfieren las señales de calor de la membrana a los factores de transcripción (Saidi *et al.*, 2011). La expresión de CaM3 y CaM7 bajo estrés por calor se conoce en *Arabidopsis* (Liu *et al.*, 2005) y se ha visto un aumento de la termotolerancia en plantas que han sobreexpresado el gen *CaM3* (Zhang *et al.*, 2009).



**Figura 3.** Cascada de señalización del calcio dentro de la célula que muestra la interacción de la calmodulina (CaM3), la proteína quinasa de unión al calcio (CBK) y la proteína quinasa dependiente de calcio (CDPK) en su papel en la expresión de los HsfA2 y HsfA1a (Sajid *et al.*, 2018).

#### 7.4.- Acumulación de osmolitos compatibles

Frente a una situación de estrés la planta sufre una reorganización metabólica cuya finalidad es el mantenimiento de la homeostasis. En este proceso la planta sintetiza metabolitos que le ayuden a protegerse, algunos de estos metabolitos son los osmolitos compatibles. Estos compuestos orgánicos son altamente solubles, mantienen el equilibrio osmótico y estabilizan las proteínas y las membranas (Nahar *et al.*, 2016). Se cree que la acumulación de estos compuestos puede estar asociada con una mayor tolerancia al estrés en las plantas. Algunos ejemplos de osmolitos compatibles son la prolina, la glicina betaína, el manitol o sorbitol, entre otros. La prolina y la glicina betaína (GB) son muy importantes ya que tienen un gran poder detoxificante de las especies reactivas de oxígeno. Son varias las evidencias que

respaldan el papel de estos osmolitos frente al estrés por calor. Un ejemplo de ello es el experimento de Rasheed *et al.* (2011) en donde demostró que la exposición prolongada a prolina y la glicina betaína disminuía la producción de peróxido de hidrógeno y que aumentaba la acumulación de azúcares solubles que protegían a los tejidos en desarrollo de los efectos del estrés por calor. Otro ejemplo es el estudio de Kaushal *et al.* (2011) en donde demostró que la prolina inducía termotolerancia en plantas de garbanzo. Todo esto evidencia la importancia de estos osmolitos como mecanismos de adaptación frente al aumento de temperaturas.

## 7.5 Hormonas

Las fitohormonas son segundos mensajeros que coordinan las vías de transducción de señal durante las respuestas al estrés, intervienen en la comunicación intra/intercelular y planta-entorno. Estas señales activan varias vías de transducción paralelas, que a menudo involucran fosfatasa y proteínas quinasas (Kosová *et al.*, 2015). Las fitohormonas son compuestos endógenos sintetizados por la propia planta regulando procesos fisiológicos a bajas concentraciones, las más importantes por su papel en la termotolerancia como respuesta al aumento de temperaturas son el ácido abscísico, el ácido salicílico, las citoquinas, el etileno, y las giberelinas. A continuación las abordaremos.

**Ácido abscísico (ABA)** se conoce como una hormona retardante de crecimiento, inhibe la germinación de las semillas bajo estrés y aporta tolerancia a la desecación en el embrión. Media respuestas frente al estrés abiótico como el estrés por desecación inducido por el calor, además de ser responsable del cierre estomático bajo estrés osmótico, por todo ello se la conoce comúnmente como "hormona del estrés". Se ha demostrado que la producción de ABA aumenta durante el estrés por calor, ofreciendo posteriormente una termotolerancia adquirida e incluso induciendo las actividades de las enzimas antioxidantes, la síntesis de proteínas de choque térmico y mejorando el contenido de azúcares solubles (Rezaul *et al.*, 2019).

**Ácido salicílico (SA)** El ácido salicílico es una hormona que se encarga del cierre estomático, y que está involucrada en el crecimiento y desarrollo de las plántulas. Se ha observado la

importancia de esta hormona en la termotolerancia basal y adquirida (Kotak *et al.*, 2007). También se ha observado que en situación de estrés por calor, un pretratamiento con mayores niveles de SA mejora la supervivencia de las plantas, este tratamiento también induce una mayor cantidad de azúcares solubles, enzimas antioxidantes y mejorar el rendimiento del grano (Zhang *et al.*, 2017).

**Citoquininas** regulan el crecimiento y desarrollo de las plantas, son un grupo de fitohormonas que promueven la división y la diferenciación celular, se consideran reguladores maestros durante el crecimiento y desarrollo de las plantas (Kang *et al.*, 2012). Parecen estar involucradas en la tolerancia al calor. Estudios llevados a cabo en *Agrostis stolonifera* indican que la aplicación exógena de citoquininas aminora los daños debidos al estrés por calor, ya que inhiben la acción de las proteasas sobre la ribulosa-1,5-bifosfato caboxilasa, e inducen la producción de proteínas de choque térmico (HSPs) (Veerasamy *et al.*, 2007).

**Etileno** es una hormona gaseosa, relacionada con la maduración de frutos, el control del desarrollo de la planta en las etapas de germinación, floración y fructificación. Controla también la abscisión de hojas, regula el crecimiento y respuesta a factores de estrés, y al igual que el ácido abscísico se le conoce como una hormona retardante del crecimiento. El etileno causa cierre estomático y controla la síntesis de flavonoles con propiedades antioxidantes. Su papel en la termotolerancia no es del todo claro, pero estudios actuales como el de Wu y Yang. (2019) intentar aportar información al respecto. En su estudio se observó que las plantas tratadas con etileno, tras someterlas a un estrés por calor, los niveles de oxidación de la membrana celular y la fuga de electrolitos fueron menores que en plantas no tratadas.

**Giberelinas** (GA) son promotoras del crecimiento, algunas de las respuestas más importantes en las que participan son la elongación de los entrenudos, el cuajado del fruto y el desarrollo de frutos partenocárpico. Como consecuencia del aumento de la temperatura la concentración de esta hormona (GA) comienza a disminuir, resultando en una disminución drástica del crecimiento. Una de las evidencias que respaldan el papel de las GAs en su papel en la termotolerancia es el estudio realizado en variedades sensibles y tolerantes al calor de Wu *et al.* (2016) que bajo estrés por altas temperaturas, observó una reducción del nivel de las

hormonas promotoras del crecimiento (GA, IAA y citoquininas), esta reducción fue más acusada en los genotipos sensibles. Como consecuencia el peso del grano y el tamaño de la planta se vieron mermados.

### **8.- Proteínas de choque térmico (HSPs)**

A altas temperaturas, las funciones enzimáticas se pueden interrumpir con la desnaturalización irreversible de las proteínas. En condiciones normales, las proteínas parcialmente desnaturalizadas unidas a chaperonas y las proteínas en estado nativo están en equilibrio. Con el aumento de las temperaturas aumenta la proporción de proteínas desnaturalizadas, acumulándose las proteínas mal plegadas y consecuentemente produciéndose la disminución de chaperonas libres en la célula, que como resultado provoca problemas de procesamiento en las proteínas de nueva síntesis durante el estrés (Personat, 2014). Como consecuencia de este aumento de temperaturas se inducen los factores de transcripción de choque térmico (HSF), los cuales provocan la síntesis de proteínas de choque térmico (HSP) que se encargan de reparar el daño. Por lo que frente a el estrés por altas temperaturas es común la acumulación transitoria de estas proteínas (HSP) y la reducción de la síntesis de la producción normal de proteínas. Las HSP actúan como chaperonas moleculares, evitando el mal plegamiento de proteínas recién sintetizadas y la pérdida de su conformación funcional (Park y Young, 2015) y desempeñan un papel primordial en la protección de las plantas contra el estrés intentando mantener la homeostasis celular. La síntesis de *novo* de proteínas HSP tiene como función restablecer el equilibrio de chaperonas libres.

La estructura proteica primaria para HSP está bien conservada entre procariotas y eucariotas, incluyendo las plantas superiores y el dominio de estas proteínas consiste en un dominio carboxilo terminal conservado (Helm *et al.*, 1993). Estas proteínas se localizan en lugares muy diversos como el citoplasma, el retículo endoplásmico, los cloroplastos, las mitocondrias o las membranas (Vierling 1991). Su inducción y biosíntesis es rápida e intensa e incrementa la termotolerancia de las plantas, permitiendo que los tejidos puedan soportar las exposiciones a las temperaturas que previamente resultaban perjudiciales o incluso letales. Estas proteínas también se expresan constitutivamente en células no estresadas o se inducen en etapas de

desarrollo concretas, como el desarrollo de granos de polen, germinación de semillas y maduración de los frutos (Waters, 2013). Bajo condiciones fisiológicas controlan la señalización celular, el plegamiento de proteínas, la translocación y degradación mientras que bajo estrés por calor evitan el plegamiento incorrecto (Banti *et al.*, 2010). Además, las HSPs también mejoran la estabilidad de la membrana y desintoxican las ROS al regular positivamente el sistema de enzimas antioxidantes. Se ha demostrado que la transcripción de estas chaperonas no es la mayoritaria, pero que a pesar de ello, los mutantes que carecen de HSPs presentan una supervivencia reducida condiciones de estrés por calor (Grover *et al.*, 2013).

Estas proteínas de choque térmico se dividen en cinco clases muy conservadas, clasificadas según su peso molecular (kDa), homologías de secuencias de aminoácidos y funciones: sHSP (15-30 kDa), HSP60 (57- 60 kDa), HSP70 (69-71 kDa), HSP90 (80-94 kDa) y HSP100 (100-114 kDa) (Kotak *et al.*, 2007). Las pequeñas proteínas de choque térmico (sHSP) son las más abundantes y diversas en plantas, se ha demostrado que con el aumento de las temperaturas, la expresión de las proteínas de choque térmico de pequeño tamaño aumenta en un 200% mientras que la expresión del resto de proteínas supone un aumento del 10% (Wahid *et al.*, 2007), lo que suscita un mayor interés en estas proteínas de pequeño tamaño.

### 8.1.- Diversidad de proteínas de choque térmico

Son varias las proteínas de choque térmico de interés para la adquisición de termotolerancia que están ampliamente estudiadas, entre ellas cabe destacar la importancia de las siguientes: HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y las sHSP. Se conocen muchos de los mecanismos de ellas, pero no podemos abordarlas todas en profundidad por ello a continuación se adjunta una tabla explicativa que agrupa las 5 grandes clases de proteínas de choque térmico con sus respectivos subfamilias en caso de tenerlas, sus funciones principales y sus localizaciones.

| Clases            | Miembros  | Localización                              | Funciones   | Referencias   |
|-------------------|---|---|---|---|
| <b>Hsp100/Clp</b> | Hsp100,<br>Subfamilias: Clase I (ClpB, ClpA/c, ClpD)<br>Clase II (ClpM, ClpN, ClpX, ClpY) | Citosol,<br>mitocondria y<br>cloroplastos | Desagregación, despliegue / facilitación de la reactivación de proteínas desnaturalizadas por calor | Queitsch <i>et al.</i> 2000; Fender and Connell 1990; Campbell <i>et al.</i> 2001 |

| Clases                     | Miembros  | Localización   | Funciones   | Referencias   |
|----------------------------|---|--|---|---|
| <b>Hsp90</b>               | Hsp90   | Citosol, mitocondria, cloroplastos y retículo endoplasmático | Facilitación de la maduración de las moléculas de señalización, amortiguación genética. La máquina Actaspartofa multi-chaperona junto con HSP70 y coopera con una cohorte de co-chaperona | Fender and Connell 1990; Usman et al. 2014; Wang et al. 2004  |
| <b>Hsp70</b>               |   | Citosol, mitocondria, cloroplastos y retículo endoplasmático | Prevención de la agregación, ayuda al replegamiento, importación y translocación de proteínas, transducción de señales y activación transcripcional                                       | Wang et al. 2004; Usman et al. 2014                           |
| <b>Hsp60 o Chaperonina</b> | Subfamilias grupo I y grupo II                                    | Cloroplasto, mitocondria y citosol                           | Plegado y asistencia de replegamiento   | Boston et al. 1996; Usman et al. 2014; Wang et al. 2004       |
| <b>sHsp</b>                | < 40 kDa, Hsp17.6, Hsp17.9, Hsp21, Hsp26.2, Hsp23, Hsp23.3, Hsp40 | Citosol, cloroplasto, mitocondria y retículo endoplasmático  | La prevención de la agregación, la estabilización de proteínas no nativas, funciona en asociación con HSP dependiente de ATP como HSP70   | Usman et al. 2014; Zhang and Denlinger 2010; Wang et al. 2004 |

**Tabla 1.** Lista de las proteínas de choque térmico más estudiadas incluyendo su localización y sus funciones (modificado de Wani y Kumar 2020).

### HSP pequeñas (sHSP)

En las plantas, las pequeñas proteínas de choque térmico son importantes frente a la respuesta del estrés por calor, se conocen de esta manera por su tamaño, este es pequeño y oscila entre los 12 y los 42 kDa (Shaw *et al.*, 2016). Se caracterizan por ser especialmente numerosas y diversas. En condiciones normales de crecimiento, la mayoría de estas proteínas en plantas son indetectables en tejido vegetativo, pero se inducen rápidamente en respuesta al estrés por calor (Waters, 2013). Estas proteínas pueden ofrecer tolerancia adaptativa a las plantas a altas temperaturas, muchas se expresan durante etapas específicas del desarrollo, en ausencia de estrés exógeno, como por ejemplo durante la embriogénesis y maduración de la semilla (Kotak *et al.*, 2007). Pero la característica más notable de estas proteínas es la formación de grandes estructuras oligoméricas y una estructura cuaternaria dinámica, encontramos más de un estado oligomérico (Baldwin, 2011; Waters, 2013).

## **HSP70**

Estas proteínas se han estudiado bajo estrés por calor en una gran variedad de cultivos de interés como el pimiento, el tomate, la patata o el trigo y su respuesta frente a este estrés es ampliamente conocida. Su función principal en lo que se refiere a combatir el estrés por calor, es prevenir la agregación de proteínas desnaturalizadas, así como ayudar al plegamiento de proteínas recién sintetizadas y a la estabilización proteica. También se encarga de importar proteínas a mitocondrias o al retículo endoplasmático (Mayer y Bukau 2005). Una evidencia de la importancia de esta proteína es la que aportaron Zhao *et al.* (2019) en sus investigaciones, en ella mostraron que la sobreexpresión de HSP70 en *Arabidopsis* confería termotolerancia.

### **8.2.- Promotores y elementos de choque térmico**

La expresión de las proteínas de choque térmico se induce por factores de transcripción de estrés por calor (HSF) que se unen a elementos de choque térmico en los promotores de HSP (von Koskull-Doring *et al.*, 2007). Los elementos de choque térmico tienen un papel clave la regulación transcripcional de los genes de choque térmico (Mittal *et al.*, 2011). Estos elementos se caracterizan por ser palindrómicos y por estar altamente conservados con el motivo de consenso “nGAAnnTTCn”, el motivo básico presenta mínimo de 3 pares de bases (nGAAn), dispuestos en forma de repetición contigua inversa.

### **9.- Diversidad de factores de transcripción frente al estrés abiótico (FT)**

La diversidad de los factores de transcripción es muy elevada, en algunas especies de interés cultivable como el sorgo, el arroz o el maíz se ha informado de la presencia de un total de 2448, 1611 y 3337 factores de transcripción respectivamente en varios estudios actuales (Wang *et al.*, 2011; Kimotho *et al.*, 2019).

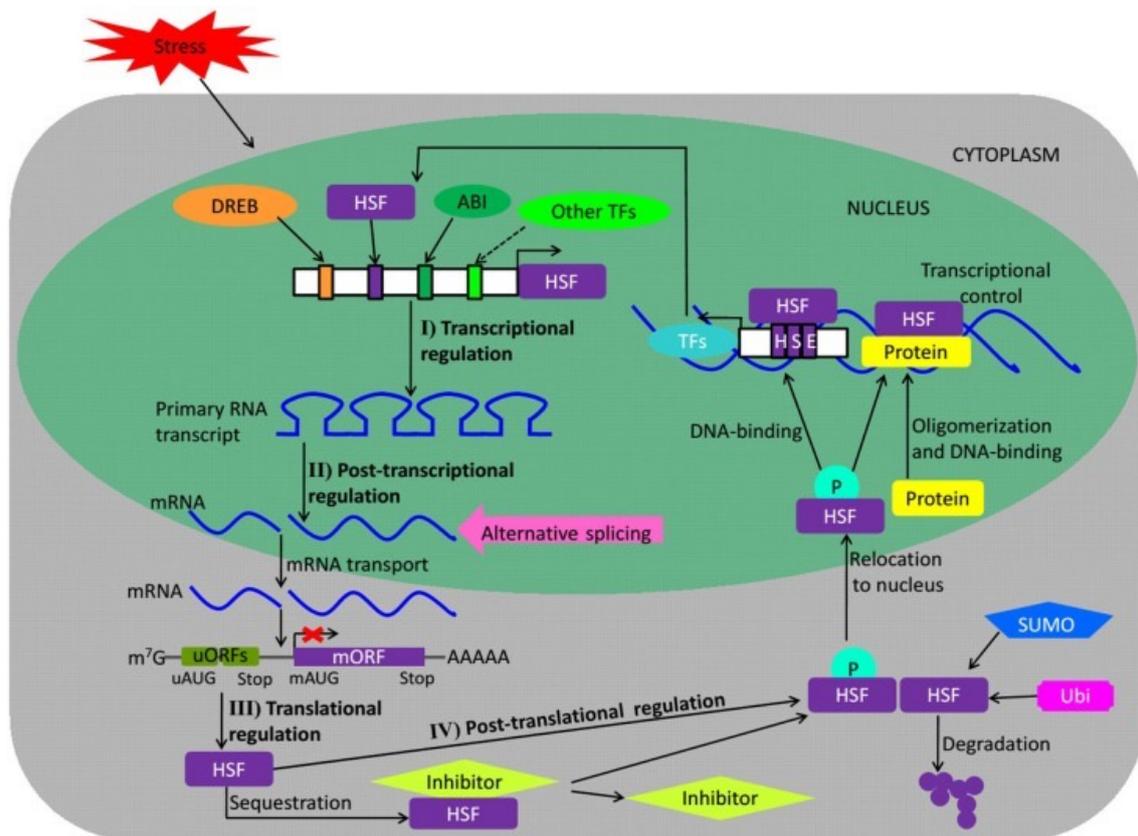
#### **9.1.- Factores de transcripción de choque térmico (HSF)**

Los factores de transcripción de choque térmico son los principales reguladores de la respuesta genética al estrés por calor, están altamente conservados tanto estructural como funcionalmente y la acumulación de las proteínas de choque térmico está regulada por ellos. Los HSFs son los componentes reguladores centrales frente a la respuesta al estrés por calor y

controlan la transcripción de más de 240 genes en *Arabidopsis thaliana* en situaciones de estrés por altas temperaturas (Liu y Charng 2013). El conocimiento actual de los mecanismos moleculares de los HSF en plantas está basado principalmente en los análisis de *Solanum lycopersicum* y *Arabidopsis thaliana* (Yang *et al.*, 2016; Kotak *et al.*, 2007). Algunos estudios sobre *Arabidopsis* han demostrado que los genes de HSF en plantas no solo son inducidos cuando se produce la situación de estrés sino que también son inducidos durante el desarrollo y la diferenciación celular. En lo que se refiere a su respuesta frente al estrés por altas temperaturas, estos factores se unen específicamente a los elementos de choque térmico de los promotores (HSE). Su estructura está compuesta por un dominio de unión al DNA N-terminal muy conservado caracterizado por un motivo HLH (hélice-giro-hélice) y un dominio de oligomerización adyacente con un patrón de repetición (Scharf *et al.*, 2012). Este dominio es importante en la activación dependiente del estrés ya que cambia los monómeros de los factores de transcripción de choque térmico inactivos a la forma trimérica activa, lo que provocará que se unan específicamente a los HSE en el promotor de genes regulados por HSF (Scharf *et al.*, 2012). Los HSF según sus dominios de oligomerización y sus sitios de unión se clasifican en tres clases evolutivas denominadas HsfA, HsfB y HsfC (Tripp *et al.*, 2009). De estos tres grupos la clase A forma una importante redreguladora durante la respuesta al estrés por calor.

## **9.2.- Regulación**

En lo que refiere a la expresión génica, está modulada a todos los niveles: transcripcional, postranscripcional, traduccional y postraduccionalmente. La actividad los factores de transcripción de choque térmico, está controlada por interacciones con chaperonas moleculares (Akerfelt *et al.*, 2010). La transcripción es el primer paso que regula la actividad de un gen. En situaciones de estrés por calor, esta actividad comienza con la unión de los factores de transcripción (HSF) a los HSE de los promotores, pero también algunas proteínas reguladoras como las denominadas proteínas de unión a elementos de respuesta a la deshidratación (Dehydration Responsive Element Binding protein o DREB) se unen a secuencias ubicadas aguas arriba e influyen en la transcripción (Guo *et al.*, 2016). Una vez realizada la transcripción, tendremos un ARN mensajero en el citoplasma que será el portador de nuestra señal. A continuación en la etapa postranscripcional se procesa y da estabilidad a



**Figura 4.** Esquema que muestra la regulación de HSF a nivel de transcripción, postranscripción, traducción y postraducción durante el estrés (Guo *et al.*, 2016).

estos ARNm. El control postranscripcional de HSF también se regula mediante splicing alternativo. Un ejemplo de ello es el observado en *Medicago sativa* donde se ha visto que el gen *MsHSF1* tiene cuatro exones y tres intrones, y después del *splicing* alternativo se generan cinco isoformas, una de ellas la MsHSF1b es la más común y codifica una proteína HSFA1, mientras que las otras cuatro son menos abundantes (He *et al.*, 2007). Esto demuestra que la regulación postranscripcional frente a este estrés abiótico es muy variada. Una vez acontecida esta etapa postranscripcional se transportará el ARNm fuera del núcleo, al citoplasma, en donde dará comienzo la traducción en los ribosoma a través de pequeños marcos de lectura abiertos situados antes del ORF principal (uORF, upstream Open Reading Frame), y recientemente se ha sugerido que estos uORF serán los reguladores de la traducción de los HSF (Jorgensen y Dorantes-Acosta, 2012; von Arnim *et al.*, 2014; Fragkostefanakis *et al.*, 2015), a pesar de que la información actual sobre ellos está limitada a *Arabidopsis*. Después del proceso de traducción viene una etapa postraduccional en donde se pueden producir fosforilaciones en la proteína traducida, lo que o bien la activará o hará que sufra una

degradación por proteosomas y ubiquitina. Algunas de las proteínas traducidas por los HSF pueden ser secuestradas por sus inhibidores. Las modificaciones postraduccionales de las proteínas HSF activadas pueden provocar que los factores de choque térmico se homo- o heterodimericen o se unan a los promotores de sus genes diana para controlar su expresión (Guo *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2010) y recluten histonas, confiriendo como resultado una tolerancia térmica adquirida por la planta, por lo que es muy importante la expresión oportuna de HSP bajo estrés por calor para obtener esta termotolerancia. Diversos estudios afirman que algunos de estos factores de transcripción (HSF) se expresan de manera constitutiva como respuesta al estrés ambiental. Por ejemplo en el caso de la especie modelo *Arabidopsis thaliana* un estudio de Wunderlich *et al.* (2007) mostró que diferentes clases HSFA juegan un papel importante en etapas tempranas y tardías de la respuesta al estrés. Durante las etapas tempranas se considera que los HSF se expresan de manera constitutiva en la célula y que inmediatamente después del estrés pueden activarse. Algunos autores proponen que la activación de estos factores de transcripción de estrés térmico se produce a través de la vía de  $Ca^{2+}$  - CaM quinasa (Saidi *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2009).

### **9.3.- Factor de transcripción HSFA1, HSFA2 y HSFB1**

En la subfamilia de la clase A, los HSFA1 se consideran reguladores maestros de la respuesta frente al estrés por calor (Fragkostefanakis *et al.*, 2014), regulan la percepción de la señal, la transducción y activan una cascada transcripcional que involucra a otros HSFs, a chaperonas e incluso a otros factores de transcripción con funciones importantes en termotolerancia (Yoshida *et al.*, 2011). Además de todo esto también forma una red reguladora durante el estrés por calor. Esta red está bien estudiada en la especie *Solanum lycopersicum* y comprende los factores HSFA1, HSFA2 y HSFB1. Pero el factor de transcripción predominante en la red por sus funciones e importancia es el HSFA1, el cual se expresa de manera constitutiva, induciendo a su vez la expresión de HSFA2 y HSFB1 en respuesta al aumento de temperaturas (Guo *et al.*, 2016). También cabe destacar la importancia de HSFA2 ya se encarga de regular la síntesis de enzimas de detoxificación celular como la ascorbato peroxidasa (Sakuma *et al.*, 2006). Como resultado de esta red de factores de transcripción se induce la expresión de chaperonas moleculares (Trip *et al.*, 2009). Los genes regulados por esta red son

principalmente los involucrados en la expresión de sHSP, HSP100 y HSP70 (Kotak *et al.*, 2007).

#### **9.4.- Factor de transcripción WRKY**

Los factores de transcripción WRKY son una de las mayores familias de reguladores transcripcionales, pueden activar genes capaces de responder al estrés por calor mediante la unión de elementos de acción *cis*. Los WRKY se unen al DNA por la caja W (TTGACT / C), y su estructura se compone de 60 aminoácidos. Tienen un heptapéptido WRKYGQK en el extremo N-terminal muy conservado y un motivo de dedos de zinc (CX4-5CX22-23HXH o CX7CX23HXC) en el extremo C-terminal (Bakshi y Oelmüller 2014). Son componentes centrales de muchos aspectos del sistema inmune innato de la planta, incluyendo la inmunidad activada por patrones moleculares, la inmunidad activada por efectores, la defensa basal y resistencia sistémica adquirida (Eulgem *et al.*, 2007). Además también están involucrados en procesos importantes como el desarrollo, la germinación, la latencia en semilla y por supuesto la respuesta al estrés abiótico y biótico (Rushton *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2008). Los mecanismos de señalización y regulación transcripcional, se están descubriendo al igual que sus interacciones con MAP quinasas, MAP quinasas quinasas, calmodulina, proteínas de resistencia y otros factores de transcripción WRKY. Estos factores de transcripción activan la expresión de antioxidantes, incluidos ascorbato peroxidasa y catalasa que actúan como captadores de ROS bajo estrés por calor (Gill y Tuteja 2010). Al ser una familia tan amplia se clasifica en varias familias y subfamilias. Los grupos principales se denominan I, II y III, esta clasificación atiende a el número de dominios y el tipo de motivos de dedos zinc, cuyos miembros se distinguen por su estructura y los procesos en los que participan (Rushton *et al.*, 2010; Eulgem *et al.*, 2000).

#### **10.- Mejora genética**

La obtención de nuevas plantas termotolerantes se logra en gran medida gracias a los estudios realizados por los investigadores centrados en la búsqueda de genes expresados diferencialmente (DEGs) o en la sobreexpresión de genes de HSP o HSF debido a su gran importancia en la termotolerancia. Algunos factores como WRKY se ha demostrado que también son muy importantes en este fenómeno (Grover *et al.*, 2013). Este factor de

transcripción (WRKY) actúa como represor o activador de la expresión génica y ya se han empleado en varios estudios para mejorar la termotolerancia en plantas de tabaco, arroz o en *Arabidopsis*, obteniendo resultados alentadores, por lo que sobreexpresar estos genes, u otros de interés en plantas de cultivo es prometedor. Para lograr esta sobreexpresión génica un paso crucial es la construcción de plásmidos, seguida de la transformación del cultivo, para ella generalmente se emplea *Agrobacterium tumefaciens* como vector de transferencia de genes de interés, gracias al plásmido Ti. Un ejemplo de esto es el estudio de El-Esawi y Alayafi. (2019) en donde se sobreexpresó el gen OsRab7 en *Oryza sativa* y las plantas modificadas presentaban una mayor tasa de supervivencia, mayor contenido de proteínas y azúcares solubles así como mayor cantidad de enzimas antioxidantes y osmolitos como prolina. Otro ejemplo es el estudio realizado por Burke y Chen. (2015) en donde se sobreexpresó la proteína de choque térmico AtHSP101 en plantas de algodón observándose que bajo estrés por calor, tanto la germinación del polen como el crecimiento del tubo del polen habían mejorado en las plantas modificadas.

Pero la sobreexpresión génica no es el único mecanismo empleado para la obtención de plantas termotolerantes, sino que desde el año 2012 la técnica de edición genética CRISPR/Cas9 tiene un papel muy importante en la modificación genética. Debido a su alta eficacia y su bajo coste, estas tijeras moleculares tienen un gran potencial. El complejo CRISPR/Cas 9 es capaz de dirigirse a una secuencia diana específica y modificarla. Bien produciendo modificaciones en forma de inserciones o deleciones o bien introduciendo una secuencia concreta en el sitio de corte (Guichard *et al.*, 2019). Las diferencias en el tipo de modificación creada en nuestra secuencia diana, son consecuencia de los diferentes mecanismos de reparación del DNA. Actualmente esta técnica se ha empleado en casi 20 especies de interés agronómico y existen al menos 13 patentes sobre los nuevos enfoques CRISPR / Cas9. Al final del apartado se adjunta una tabla sobre tres de estos cultivos. La problemática de la modificación genética para crear plantas tolerantes a un único estrés estriba en la dificultad de su estudio, ya que en medios naturales las plantas están sometidas al estrés combinado, el estrés combinado induce un conjunto separado de genes que no son activados por cada estrés individual, muchos autores sugieren que estos estreses están mediados por los reguladores clave, como el caso de HSF1 en tomate. Se realiza con relativa frecuencia el

preacondicionamiento de las plantas, como ya hemos comentado en los puntos de aclimatación y termotolerancia, esto puede solucionar la necesidad inmediata de abordar este problema.

| <b>Cultivo</b> | <b>Gen diana</b>       | <b>Estrés</b>   | <b>Referencias</b>        |
|----------------|------------------------|---|---------------------------|
| <b>Maíz</b>    | <i>ARGOS8</i>          | <i>Rendimiento mejorado en condiciones de estrés por sequía</i> | Shi <i>et al.</i> (2017a) |
| <b>Arroz</b>   | <i>GS3, Gnl1a</i>      | <i>Tamaño de grano y aumento de número</i>                      | Shen <i>et al.</i> (2017) |
| <b>Trigo</b>   | <i>TaDREB2, TaERF3</i> | <i>Aumento de tolerancia frente al estrés abiótico</i>          | Kim <i>et al.</i> (2018)  |

**Tabla 2.** Enfoques de edición del genoma utilizados para la mejora del estrés por calor (Modificada Jani *et al.*, 2020)

## 11.-Conclusiones

Los mecanismos genéticos y fisiológicos de tolerancia a las altas temperaturas es una cuestión que aún no se ha resuelto, no son pocas las investigaciones que tratan de abordar este problema y en esta revisión hemos intentado resumir algunas de las aportaciones científicas más relevantes. En plantas, los efectos frente al aumento en la temperatura ambiental componen una red compleja y de respuesta múltiple. No son pocos los mecanismos fisiológicos, moleculares y genéticos de las plantas frente estrés por altas temperaturas que existen, hemos mencionado algunos de ellos pero es necesario mejorar la comprensión de cada uno e integrarlos. Esto es una estrategia clave para la creación de nuevas variedades de plantas termotolerantes. Del mismo modo, cabe destacar la especial importancia de las proteínas de choque térmico así como de los factores de transcripción en el papel de termotolerancia y supervivencia de la planta. Los nuevos desafíos que traerá consigo el cambio climático, tendrán un gran impacto en las plantas cultivables así como en los ecosistemas naturales. La capacidad de adaptación, aclimatación, termotolerancia y respuesta por parte de las plantas a estos eventos será algo clave para el mantenimiento de la producción agrícola a gran escala. Los eventos extremos son la mayor preocupación para los investigadores, porque implican cambios drásticos en la fenología, composición atmosférica y

eventos de sequía extremos. Para poder crear nuevas plantas termotolerantes debemos integrar datos, incluyendo estudios multicausales y multifactoriales, no estudiar los estreses de forma individual para así comprender mejor los mecanismos implicados. El cambio climático no es un estrés único, sino la suma de muchos factores como la sequía, el aumento de temperaturas, los cambios en la composición atmosférica y la precipitación (IPCC, 2014), por lo que mejorar nuestra comprensión es algo esencial de cara a corto-medio plazo.

## 12.- Referencias

- Akerfelt, M., Morimoto, R. I. y Sistonen, L. (2010) "Heat shock factors: integrators of cell stress, development and lifespan", *Nature reviews. Molecular cell biology*, 11(8), pp. 545–555.
- Baldwin, A. J., Lioe, H., Robinson, C. V., Kay, L. E. y Benesch, J. L. (2011) "αB-crystallin polydispersity is a consequence of unbiased quaternary dynamics", *Journal of molecular biology*, 413(2), pp. 297–309.
- Banti, V., Mafessoni, F., Loreti, E., Alpi, A. y Perata, P. (2010) "The heat-inducible transcription factor HsfA2 enhances anoxia tolerance in Arabidopsis", *Plant physiology*, 152(1), pp. 471–1483.
- Barrantes-Chaves, N. F. y Soto-Gutiérrez, M. V. (2017) "Respuesta al estrés por calor en los cultivos I. Aspectos moleculares, bioquímicos y fisiológicos", *Agronomía mesoamericana*, 28(1), pp. 237-253.
- Bitá, C. y Gerats, T. (2013) "Plant to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops", *Frontiers in plant science*, 4(273), pp 273.
- Burke, J. J. y Chen, J. (2015) "Enhancement of reproductive heat tolerance in plants", *Plos one*. doi:10.1371/journal.pone.0122933
- Chen, Y. N., Slabaugh, E. y Brandizzi, F. (2008) "Membrane-tethered transcription factors in Arabidopsis thaliana: novel regulators in stress response and development", *Current opinion in plant biology*, 11(6), pp. 695–701.
- Danquah, A., de Zelicourt, A., Jean Colcombet, J. y Hirt, H. (2014) "The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses", *Biotechnology advances*, 32(1), pp. 40–52.
- Doyle, S. M., Diamond, M. y McCabe, F. P. (2010) "Chloroplast and reactive oxygen species involvement in apoptotic-like programmed cell death in Arabidopsis suspension cultures", *Journal of experimental botany*, 61(2), pp. 473–482.
- Eulgem, T. y Somssich, I. E. (2007) "Networks of WRKY transcription factors in defense signaling", *Current opinion in plant biology*, 10(4), pp. 366–371.
- Eulgem, T., Rushton, P. J., Robatzek, S. y Somssich, I. E. (2000) "The WRKY Superfamily of Plant Transcription Factors", *Trends in plant science*, 5(5), pp. 199-206.
- El-Esawi, M y A. Alayafi, A. (2019) "Overexpression of rice rab7 gene improves drought and heat tolerance and increases grain yield in rice (*Oryza sativa* L.)", *Genes*, 10(1), 56.
- Fragkostefanakis, S., Röth, S., Schleiff, E., and Scharf, K. D. (2015) "Prospects of engineering thermotolerance in crops through modulation of heat stress transcription factor and heat shock protein networks" *Plant, cell and environment*, 38(9), pp. 1881–1895.
- Gill, S. S. y Tuteja, N. (2010) "Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants", *Plant, physiology and biochemistry*, 48(12) pp. 909–930.

- Grover, A., Mittal, D., Nagi, M. y Lavania, D. (2013) "Generating high temperature tolerant transgenic plants: Achievements and challenges", *Plant science*, 205(1), pp. 38-47
- Guichard, A., Haque, T., Bobik, M., Xu, X.S., Klanseck, C., Kushwah, R. B. S., Berni, M., Kaduskar, B., Gantz, V. M. y Bier, E. (2019) "Efficient allelic-drive in *Drosophila*", *Nature Communications* 10(1), pp 1640-1650.
- Guo, M., Liu, J-H., Ma, Xiao., Luo, D-X., Gong, Z-H. y Lu, M-H. (2016) "The Plant Heat Stress Transcription Factors (HSFs): Structure, Regulation, and Function in Response to Abiotic Stresses", *Frontiers in plant science*, 7(2), pp. 114-127
- He, Z. S., Xie, R., Zou, H. S., Wang, Y. Z., Zhu, J. B., y Yu, G. Q. (2007) "Structure and alternative splicing of a heat shock transcription factor gene, MsHSF1, in *Medicago sativa*", *Biochemical and biophysical research communications*, 364(4), pp. 1056–1061.
- Helm, K. M., Lafauette, P. R., Nagao, R. T., Key, J. L. y Vierling, E. (1993) "Localization of small heat shock proteins to the higher plant endomembrane system", *Molecular and celular biology*, 13(1), pp. 238-247.
- Hemmati H., Gupta D., Basu C. (2015) "Molecular Physiology of Heat Stress Responses in Plants", en Pandey G. (eds.) *Elucidation of Abiotic Stress Signaling in Plants*. 1ª ed. New York: Springer, pp. 109-142
- Hoekstra, A. T., Mekonnen, M. M., Chapagain, A. K., Mathews, R. E. y Richter, B. D. (2012) "Global Monthly Water Scarcity: Blue Water Footprints versus Blue Water Availability", *Plos one*, ONE 7(2), pp. e3268.
- Hong, S. W., Vierling, E. (2000) "Mutants of *Arabidopsis thaliana* defective in the acquisition of tolerance to high temperature stress", *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(8), pp. 4392–4397
- Hu, H.W., Hu C.G. y Han, B. (2009) "Genome-wide survey and expression profiling of heat shock proteins and heat shock factors revealed overlapped and stress specific response under abiotic stresses in rice", *Plant science*, 176(4), pp. 583-90.
- Hua, J. (2009) "From freezing to scorching, transcriptional responses to temperature variations in plants", *Current opinion in plant biology*, 12(5), pp. 568–573.
- IPCC (2014) "Summary for policymakers, in *Climate Change 2014: Impacts, Adaptation, and Vulnerability. Part A: Global and Sectoral Aspects. Contribution of Working Group II to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*", Field C. B., Barros V. R., Dokken D. J., Mach K. J., Mastrandrea M. D., Bilir T. E., Chatterjee M., Ebi K. L., Estrada Y. O., Genova R. C., Girma B., Kissel E. S., Levy A. N., MacCracken S., Mastrandrea P. R., White L. L. eds Cambridge, UK; New York, NY: Cambridge University Press pp. 1–32.
- Janni, M., Gulli, M., Maestri, E., Marmioli, M., Valiiyodan, B., Nguyen, H. T. y Marmioli, N. (2020) "Molecular and genetic bases of heat stress responses in crop plants and breeding for increased resilience and productivity", *Journal of experimental botany*. doi:10.1093/jxb/eraa034
- Jorgensen, R. A., y Dorantes-Acosta, A. E. (2012) "Conserved peptide upstream open reading frames are associated with regulatory genes in angiosperms", *Frontiers in plant science*, 3(2), pp.191-202
- Kaushal, N.,m Gupta, K., Bhandahari, Kumar, S., Thakur, P. y Nayvar, H. (2011) "Proline induces heat tolerance in chickpea (*Cicer arietinum* L.) plants by protecting vital enzymes of carbon and antioxidative metabolism", *Physiology and molecular biology of plants*, 17(3), pp. 203-13.
- Kang, N. Y., Cho, C. Kim, N. Y. y Kim J. "Cytokinin receptor-dependent and receptor-independent path ways in the dehydration response of *Arabidopsis thaliana*" *Journal of plant physiology*, 169(1), pp. 1382-1391
- Kimberlayn, M., Sanabria, A. y Herbert, O. (2018) "Aclimatación a alta temperatura y tolerancia al calor (TL50) en 6 variedades de *chenopodium quinoa*", *Revista peruana de biología*, 25(2), pp. 147-152.
- Kimotho, N., Baillo, E. H. y Zhang, Z. (2019) "Transcription factors involved in abiotic stress responses in maize (*Zea mays* L.) and their roles in enhanced productivity in the post genomics era", *Peer journal*. doi: 10.7717/peerj.7211.

- Kosová, K., Vitámvás, P., Urban, M. O., Klima, M., Roy, A. y Prášil, I. T. (2015) “Biological networks underlying abiotic stress tolerance in temperate crops- A proteomic perspective”, *International journal of molecular sciences*, 16(9), pp. 20913-20942.
- Kotak, S., Larkindale, J., Lee, U., von Koskull-Döring, P., Vierling, E. y Scharf, K-D. (2007) “Complexity of the heat stress response in plants”, *Current opinion in plant biology*, 10(3), pp. 310–316.
- Kotak, S., Vierling, E., Bäumlein, H. y von Koskull-Döring, P. (2007) “A novel transcriptional cascade regulating expression of heat stress proteins during seed development of Arabidopsis”, *Plant cell*, 19(1), pp. 182–195.
- Li, S., Zhou, X., Chen, L., Huang, W. y Yu, D. (2010) “Functional characterization of Arabidopsis thaliana WRKY39 in heat stress”, *Molecules and cells*, 29(5), pp 475–483
- Liu, H. C. y Charng, Y. Y. (2013) “Common and distinct functions of Arabidopsis class A1 and A2 heat shock factors in diverse abiotic stress responses and development”, *Plant physiology*, 163(1), 276–290.
- Liu, H. T., Un, D. Y. y Zhou, R. G. (2005) “Ca<sup>2+</sup> and AtCaM3 are involved in the expression of heat shock protein gene in Arabidopsis”, *Plant, cell and environment*, 28(10), pp. 1276–1284.
- Lobell, D. B., Schlenker, W. y Costa-Roberts, J. (2011) "Climate trends and global crop production since 1980", *Science*, 333(6042), pp. 616–620
- Madhunita Bakshi y Ralf Oelmüller (2014) "WRKY transcription factors Jack of many trades in plants", *Plant signaling and behaviour*, 9(2), e27700.
- Mathur, S., Afrawal, D. y Jajoo, A. (2014) “Photosynthesis: Response to high temperature stress”, *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*, 137(8), pp. 116-126.
- Mayer, M. P. y Bukau, B. (2005) “Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism”, *Cellular and molecular life sciences*, 62(6), pp. 670–684.
- Mittal, D., Madhyastha, D. A. y Grover, A. (2012) "Grover, Genome-wide transcriptional profiles during temperature and oxidative stress reveal coordinated expression patterns and overlapping regulons in rice", *Plos one*, 7(7): e40899
- Mittal, D., Enoki, Y., Lavania, D., Singh, A., Sakurai, H. y Grover, A. (2011) “Binding affinities and interactions among different heat shock element types and heat shock factors in rice (*Oryza sativa* L.)”, *The febs journal*, 278(17), pp. 3076–3085.
- Mittler, R., Finka, A. y Goloubinoff, P. (2012) "How do plants feel the heat?", *Trends in biochemical sciences*, 37(3) pp. 118-125.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Gollery, M. y Van Breusegem, F. (2004) “The reactive oxygen gene network in plants”, *Trends in plant science*, 9(10), pp. 490-498.
- Nahar, K., Hasanuzzaman, M. y Fujita, M. (2016) “Roles of osmolytes in plant adaptation to drought and salinity” Iqbal, N., Nazar, R., Khan, N. A. Osmolytes and Plants Acclimation to Changing Environment: Emerging Omics Technologies. 1<sup>a</sup> ed. New Delhi: Springer, pp 37-68.
- Park, C. J. y Young, S. S. (2015) “Heat shock proteins: A review of the molecular chaperones for plant immunity”, *The plant pathology journal*, 31(4), pp. 323-333.
- Personat, J. M., Tejedor-Cano, J., Prieto-Dapena, P., Almoguera, C. y Jordano, J. (2014). "Co-overexpression of two Heat Shock Factors results in enhanced seed longevity and in synergistic effects on seedling tolerance to severe dehydration and oxidative stress", *BMC plant biology*, 14(1), pp. 1-56.
- Pirasteh-Anosheh, H., Saed-Moucheshi, A., Pakniyat, H. y Pessarakli, M. (2016) “Stomatal responses to drought stress” en Ahmad, P, (eds.) *Water stress and crop plants*, 1<sup>a</sup> ed India: Wiley, pp. 24-40.
- Rasheed, R., Wahid, A., Farooq, M., Hussain, I. y Basra, S. M. (2011) “Role of proline and glycine betaine pre-treatments in improving heat tolerance of sprouting sugarcane (*Saccharumsp.*) buds”, *Plant growth regulation*, 65(1), pp. 35–45.

- Rezaul, I. M., Baohua, F., Tingting, C., Weimeng, F., Caixia, Z., Longxing, T. y Guanfu, F. (2019) "Abscisic acid prevents pollen abortion under high-temperature stress by mediating sugar metabolism in rice spikelets", *Physiologia Plantarum*, 165(3), pp. 644–663.
- Ruelland, E. y Zachowski, A. (2010) "How plants sense temperature", *Environmental and experimental botanic*, 69(3), pp. 225-232.
- Rushton, D. L., Tripathi, P., Rabara, R. C., Lin, J., Ringler, P., Boken, A. K., Langum, T. J., Smidt, L., Boomsma, D. D., Emme, N. J., Chen, X., Finer, J. J., Shen, Q. J. y Rushton P. L. (2011) "WRKY transcription factors: key components in abscisic acid signalling", *Plant biotechnology journal*, 10(1), pp. 2-10.
- Rushton, P. J., Somssich, I. E., Ringler, P. y Shen, Q. J. (2010) "WRKY transcription factors", *Trends in plant science*, 15(5), pp. 247–258.
- Saidi, Y., Finka, A. y Goloubinoff, P. (2011) "Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance", *New phytologist*, 190 (3), pp. 556–565.
- Saidi, Y., Frink, A., Muriset, M., Bromberg, Z., Weiss, Y. G., Maathuis, F. J. M. y Goloubinoff, P. (2009) "The heat shock response in most plants is regulated by specific calcium-permeable channels in the plasma membrane", *Plant cell*, 21(9), pp. 2829–2843.
- Sajid, M., Rashid, B., Ali, Q. y Husnain, T. (2018) "Mechanisms of heat sensing and responses in plants. It is not all about Ca<sup>2+</sup> ions", *Biologia plantarum*, 62(3), pp. 409-420.
- Sakuma, Y., Maruyama, K., Qin, F., Osakabe, Y., Shinozaki, K. y Yamaguchi, K. (2006) "Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water stress-responsive and heat stress responsive gene expression", *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, 103(49), pp. 18822–18827.
- Savchenko, G. E., Klyuchareva, E. A., Abramchik, L. M. y Serdyuchenko, E. V. (2002) "Effect of periodic heat shock on the inner membrane system of etioplasts", *Russian journal of plant physiology*, 49(3), pp. 349–359.
- Scharf, K. D., Berberich, T., Ebersberger, I. y Nover, L. V. (2012) "The plant heat stress transcription factor (Hsf) family: structure, function and evolution", *Biochimica et Biophysica Acta*, 1819(2), pp. 104–119.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S. y Pessarakli, M. (2012) "Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions", *Journal of botany*, 2012(1), pp. 1-26.
- Shaw, A. K., Bhardwaj, P. K., Ghosh, S., Roy, S., Saha, S., Sherpa, A. R., Saha, S. K. y Hossain, Z. (2016) "β-Aminobutyric Acid Mediated Drought Stress Alleviation in Maize (*Zea mays*L.)", *Environmental science and pollution research*, 23(3), pp. 2437–245
- Singh, D., Singh, K. C., Taunk, J., Jadon, V., Pal, M. y Gaikwad, K. (2019) "Genome wide transcriptome analysis reveals vital role of heat responsive genes in regulatory mechanisms of lentis (*Lens culinaris* Medikus)", *Science reports* 9(1), 12976.
- Takahashi, F. y Shinozaki, K. (2019) "Long-distance Signaling in Plant Stress Response", *Current opinion in plant biology*, 47(2), pp. 106-111.
- Tripp, J., Mishra, S. K. y Scharf, K. D. (2009) "Functional dissection of the cytosolic chaperone network in tomato mesophyll protoplasts", *Plant, cell and environment*, 32(2), pp. 123-133.
- Veerasamy, M., He, Y. y Huang, B. (2007) "Leaf senescence and protein metabolism in creeping bentgrass exposed to heat stress and treated with cytokinins", *Journal of the american society for horticultural science*, 132(2), pp. 467-472.
- Vierling, E. (1991) "The roles of heat shock proteins in plants", *Annual review of plant physiology and plant molecular biology*, 42(1), pp. 579–620.
- Von Koskull-Döring, P., Scharf, K-D. y Nover, L. (2007) "The diversity of plant heat stress transcription factors", *Trends in plant science*, 12(10), pp. 452–457.

von Arnim, G., Jia, Q. y Vaughn, N. J. (2014) "Regulation of plants translation by upstream open reading frames", *Plant science*, 214(1), pp. 1-12.

Wada, Y., van Beek, H. P. L. y Bierkens, P. F. M. (2012) "Nonsustainable groundwater sustaining irrigation: A global assessment", *Water resources research*, 48(6), pp. 1-16.

Wahid, A. y Close, T. J. (2007) "Expression of dehydrins under heat stress and their relationship with water relations of sugarcane leaves", *Plant biology*, 51(1), pp. 104–109

Wang, J., Zhou, J., Zhang, B., Vanitha, J., Ramachandran, S. y Jiang, S. Y. (2011) "Genome-wide Expansion and Expression Divergence of the Basic Leucine Zipper Transcription Factors in Higher Plants with an Emphasis on Sorghum. *J. Integr*", *Plant biology*, 53(3), pp. 212–231.

Wani, S. H. y Kumar, V. (2020) *Heat Stress Tolerance in Plants: Physiological, Molecular and Genetic Perspectives* 1.<sup>a</sup> ed. India: Wiley

Waters, E. R. (2013) "The evolution, function, structure, and expression of the plant sHSPs", *Journal of experimental botany*, 64(2), pp. 391-403.

Wu, C., Cui, K., Wang, W., Li, Q., Fahad, S., Hu, Q., Huang, J., Nie, L. y Peng, S. (2016) "Heat-induced phytohormone changes are associated with disrupted early reproductive development and reduced yield in rice", *Scientific reports*, doi: 10.1038/srep34978

Wu, Y. y Yang, C. (2019) "Ethylene-mediated signaling confers thermotolerance and regulates transcript levels of heat shock factors in rice seedlings under heat stress", *Botanical studies*, 60(1), pp. 23.

Wu, H. C. y Jinn T. L (2010) "Heat shock-triggered Ca<sup>2+</sup> mobilization accompanied by pectin methylesterase activity and cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillation are crucial for plant thermotolerance" *Plant signal & behavior*, 5(10), pp. 1252–1256.

Wu, H-C., Hsu, S-F., Luo, D-L., Chen, S-L., Huang, W-D-, Lur, H-S. y Jinn, T-L. (2010) "Recovery of heat shock-triggered released apoplasmic Ca<sup>2+</sup> accompanied by pectin methylesterase activity is required for thermotolerance in soybean seedlings", *Journal of experimental botany*, 61(10), pp. 2843-2852.

Wunderlich, M., Doll, J., Busch, W., Kleindt, C. K., Lohmann, C. y Schöffl, F. (2007) "Heat shock factors: regulators of early and late functions in plant stress response", *Plant stress*, 1, pp.16–22.

Yang, X., Zhu, W., Zhang, H., Liu, N. y Tian, S. (2016) "Heat shock factors in tomatoes: Genome-wide identification, phylogenetic analysis and expression profiling under development and heat stress", *Peer journal*, 4(5), pp. 1961.

Yoshida, T., Ohama, N., Nakajima, J., Kidokoro, S., Mizoi, J., Nakashima, K., Maruyama, K., Kim, J-M., Seki, M. y Todaka, D. (2011) "Arabidopsis HsfA1 transcription factors function as the main positive regulators in heat shock-responsive gene expression", *Molecular genetics and genomics*, 286(5-6), pp. 321–332.

Zhang, C. X., Feng B. H., Chen, T. T., Zhang, X. f, Tao, L. X. y Fu, G. F. (2017) "Sugars antioxidant enzymes and IAA mediate salicylic acid to prevent rice spikelet degeneration caused by heat stress", *Plant growth regulation*, 83(2), pp. 313-323.

Zhang, W., Zhoy, R-G., Gao, Y-J., Zheng, S-Z., Xu, P., Zhang, S-Q. y Sun, D-Y. (2009) "Molecular and genetic evidence for the key role of AtCaM3 in heat-shock signal transduction in Arabidopsis", *Plant Physiology* 149(4), pp. 1773–1784.

Zhao, D., Xia, X., Su, J., Wei, M., Wu, Y. y Tao, J (2019) "Overexpression of herbaceous peony HSP70 confers high temperature tolerance", *BMC genomics*, 20(1), pp. 70.

A 30 de Junio de 2020

Fdo:

María Baztán Borjabad

