UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FACTORES TRANSCRIPCIONALES TIPO AP2 INVOLURADOS EN LA RESPUESTA A SEQUÍA EN FRIJOL (*Phaseolus vulgaris*)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

ANA LILIA JUÁREZ VÁZQUEZ

DIRECTOR DE TESIS:
DR. FRANCISCO CAMPOS ÁLVAREZ
2009

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Hoja de datos del jurado

1. Datos del alumno. Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s): Teléfono: Universidad: Facultad o escuela: Carrera: Número de cuenta:	1. Datos del alumno. Juárez Vázquez Ana Lilia 53 10 78 47 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 301254573
2. Datos del tutor. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):	2. Datos del tutor. Dr. Campos Álvarez Francisco
3. Datos del sinodal 1. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):	3. Datos del sinodal 1. Dra. Covarrubias Robles Alejandra Alicia
4. Datos del sinodal 2. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):	4. Datos del sinodal 2. Dra. Osuna Fernández Helia Reyna
5. Datos del sinodal 3. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):	5. Datos del sinodal 3. Dr. Reyes Taboada José Luis
6. Datos del sinodal 4. Grado: Apellido paterno: Apellido materno: Nombre(s):	6. Datos del sinodal 4. M. en C. Olivera Flores Ma. Teresa
7. Datos del trabajo escrito. Título: Número de páginas: Año:	7. Datos del trabajo escrito. Identificación y caracterización de Factores Transcripcionales tipo AP2 involucrados en la respuesta a sequía en frijol (*Phaseolus vulgaris*). 60 2009

Agradecimientos.

A los miembros del jurado del examen para la obtención de grado, por sus correcciones y críticas constructivas del trabajo de tesis, pero sobre todo por el apoyo brindado.

PRESIDENTE	*Dra. Alejandra Covarrubias Robles*
SECRETARIO	*Dra. Helia Reyna Osuna Fernández*
VOCAL	*Dr. José Luis Reyes Taboada*
SUPLENTE	*Dr. Francisco Campos Álvarez*
SUPLENTE	*M. en C. Ma. Teresa Olivera Flores*

Al Dr. Francisco Campos Álvarez, por su paciencia, apoyo, confianza, ánimos, y sobre todo por compartirme sus conocimientos y por haberme enseñado a exigirme siempre lo mejor y dar el 200%.

A la Dra. Alejandra Covarrubias por ser una excelente líder de trabajo, y motivarnos siempre a seguir adelante.

Al Q.B.P. Gabriel Guillen Solis, por ayudarme con algunas técnicas de PCR utilizadas en este trabajo.

A mi familia, en primer lugar a mis padres Sara y Polo quienes me han procurado con su confianza y apoyo incondicional, a mis hermanos: Janet, por ser un ejemplo a seguir, Bere y Adrián por ser un ejemplo de vida y compartirme sus alegrías. A Rayito por ser el diamante que nos motiva, y a mis queridos animales.

A José Luis Puente, por iniciarnos en el mundo de la investigación; a mis amigos del Taller y compañeros de laboratorio: Adrianita, Bety , Carlos, Caty, Candy, Daniel, Doña Chuy, Erickita, Fer, José Luis, Kike, Lucerito, Luis Med, Marina, Omar, Pancho, Pepe, Rosy, Sergio, Sonia, Yadira, porque de ellos aprendí mucho en mi estancia en el Laboratorio.

A mis amigos de toda la vida por compartir los buenos y malos momentos gracias: Alina, Citlali, Daniel, David, Ere, Elvira, Giovanni, Imelda, Ivonne, Janet, Javier, Jimena, Jorge, Lauris, Lore, Lucy, Luis, Felipe, Vladis, a los chicos del Universum. A los que faltaron, pero que se han cruzado en el camino.

Este es el primer paso, de un largo pero agradable camino.

ÍNDICE

ÍNDICE I
ÍNDICE DE FIGURAS. III
ABREVIATURAS I
RESUMEN 1
INTRODUCCIÓN 3
I.LAS PLANTAS BAJO ESTRÉS 3
I.1. EL EFECTO DEL ESTRÉS HÍDRICO EN LA PLANTA. 5
II. GENES INDUCIDOS DURANTE EL DÉFICIT HÍDRICO 6
III. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES DURANTE DÉFICIT HÍDRICO 7
III.1. LA FITOHORMONA ABA. 7
III.2. VÍA DEPENDIENTE DE ABA 8
III.3. VÍA INDEPENDIENTE DE ABA 10
IV. FACTORES TRANSCRIPCIONALES 12
IV.1. FACTORES TRANSCRIPCIONALES INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DEL ESTRÉS HÍDRICO 12
IV.2. FAMILIA DE FACTORES TRANSCRIPCIONALES TIPO AP2 13
IV.2.1 La subfamilia ERF *14*
IV.2.2. La subfamilia DREB *15*
V. FRIJOL 18
V.1. PROYECTOS GENÓMICOS 18
ANTECEDENTES 19
JUSTIFICACIÓN. 20
HIPÓTESIS 21
OBJETIVO GENERAL 21
OBJETIVOS PARTICULARES 21
MATERIAL Y MÉTODOS 22
I. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO 22
II. AISLAMIENTO DE RNA Y ANÁLISIS POR "NORTHERN" 22
II.1. CONDICIONES DE HIBRIDACIÓN. 23
II.2. MARCAJE DE LA SONDA 23
III. OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO 23
III.1. CLONACIÓN DE PRODUCTOS OBTENIDOS POR PCR 24
III.2. TRANSFORMACIÓN Y SELECCIÓN DE PLÁSMIDOS RECOMBINANTES. 25
IV. OBTENCIÓN DE LOS GENES 25
IV.1. RACE 3' 25
IV.2. OBTENCIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN *PvER001*. 28
V. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO 29
V.1. ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS 30

V.2. IDENTIFICACIÓN DE POSIBLES SEÑALES DE LOCALIZACIÓN SUBCELULAR 31
V.III. IDENTIFICACIÓN DE ELEMENTOS *CIS IN SILICO* 31

RESULTADOS 32

I. IDENTIFICACIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA FT TIPO AP2 EN FRIJOL 32

I.1 ANÁLISIS DE LOS ESTS OBTENIDOS 32
I.2. ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS GENES DE *PHASEOLUS VULGARIS* CONTENIENDO EL DOMINIO AP2 35

II. CARACTERIZACIÓN DE LOS GENES *PVERF001* Y *PVERF002* 37

II.1 OBTENCIÓN DEL GEN *PVERF001* 38
II.1.1 Obtención del gen completo PvERF001 por 3'-RACE 38
II.1.2 Obtención del gen completo PvERF001 mediante el ensamble de 38
ESTs 38
II.1. OBTENCIÓN DEL GEN *PVERF002* 40
II.2 ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE LAS PROTEÍNAS DEDUCIDAS DE LOS GENES *PVRF001* Y *PVERF002* 42
II.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *PVERF001* Y *PVERF002 IN SILICO.* 45
II.4 CARACTERIZACIÓN DE LOS PATRONES DE ACUMULACIÓN DE LOS MRNAS DE LOS GENES *PVERF001* Y *PVERF002* EN RESPUESTA A SEQUÍA. 46

III. OBTENCIÓN DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN *PVERF001* 47

III.1 ANÁLISIS COMPUTACIONAL DE LAS SECUENCIAS REGULATORIAS DE LA REGIÓN PROMOTORA DEL GEN *PVERF001* 48

DISCUSIÓN 50

IDENTIFICACIÓN Y CLASIFICACIÓN DE FT TIPO AP2 DE FRIJOL 50
PVERF001 Y PVERF002 SE ACUMULAN ABUNDANTEMENTE EN PLÁNTULAS DE 4 DÍAS Y SU ACUMULACIÓN SE MODULA POR ESTRÉS HÍDRICO EN PLANTA ADULTA 52
PVERF001 PRESENTA UN MOTIVO DE REPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL. 53

CONCLUSIONES 55

REFERENCIAS 56

Índice de Figuras.

Figura 1. Respuesta de la planta al estrés abiótico..... 4
Figura 2. Vías de la regulación transcripcional en *Arabidopsis* durante el estrés hídrico: vía Independiente de ABA y vía dependiente de ABA..... 11
Figura 3. Árbol filogenético de los factores transcripcionales tipo AP2 de *Arabidopsis thaliana.* 14
Figura 4. Modelo propuesto para la transducción de señales de las proteínas DREB y ERF 17
Figura 5. Esquema del vector de clonación PCR® 2.1 TOPO®..... 24
Figura 6. Técnica del RACE 3′, empleada para obtener el extremo 3′ faltante del gen PvERF001..... 27
Figura 7. Esquema de la estrategia Genome Walker utilizada para la obtención del promotor del gen *PvERF001.* 29
Figura 8. Árbol filogenético de los Factores Transcripcionales tipo AP2 de Phaseolus.....36
Figura 9. Obtención del gen completo *PvERF001.*..... 39
Figura 10. Obtención del gen PvERF002..... 41
Figura 11. Identificación de posibles señales de localización subcelular en las proteínas *PvERF001* y *PvERF002*..... 43
Figura 12. Análisis estructural de las proteínas *PvRF001* y *PvERF002*..... 44
Figura 13. Patrones de acumulación de los transcritos de los genes *PvERF001* y el *PvERF002* en respuesta a sequía.. 47
Figura 14. Región promotora del gen *PvERF001* 49

ABREVIATURAS

A14	Alanina en la posición 14, contenido en el dominio AP2.
ABA	Ácido abscísico.
abi	Mutante Insensible a ABA.
ABRE	Elementos de Respuesta a ABA.
AP2	Superfamilia de Factores Transcripcionales que contienen el dominio de unión a DNA, AP2.
bZIP	Familia de Factores transcripcionales con un dominio básico de cierre de Leucinas.
CE	Elementos acopladores.
AREB	Proteínas de unión a ABRE
DRE	Elemento de Respuesta a Deshidratación.
DREB	Proteína de unión al Elemento de Respuesta a Deshidratación independiente de ABA.
DREB1	Proteína de unión al Elemento de Respuesta a Deshidratación, durante bajas temperaturas.
DREB2	Proteína de unión al Elemento de Respuesta a Deshidratación, durante salinidad y estrés hídrico.
E19	Ácido glutámico en la posición 19, contenido en el dominio AP2.
ERF	Elemento de Respuesta al Etileno/Familia de Factores Transcripcionales que responden a ERF.
ESTs	Secuencias en Tags que se expresan.
FT	Factores de Transcripción.
LEA	Proteínas Abundantes de Embriogénesis tardía.
MYB	Factor Transcripcional que se une a elementos en cis en el promotor del gen RD22
MYC	Factor Transcripcional que se une a elementos en cis en el promotor del gen RD22
NLS	Secuencia de Localización Nuclear.

Resumen

El estrés de tipo hídrico en plantas provoca una serie de cambios desde fisiológicos y morfológicos, hasta alteraciones en la expresión génica. Estos cambios afectan el crecimiento de la planta y por tanto su productividad. La familia de factores transcripcionales (FT) tipo AP2 ha sido ampliamente descrita en plantas modelo como *Arabidopsis thaliana*, algunos de sus miembros como las proteínas tipo DREB (del inglés Drougth responsive element binding protein), regulan la expresión de los genes que responden a sequía por una vía independiente de Ácido abscísico (ABA)

Aunque estos FT se han caracterizado en *Arabidopsis* poco se conoce sobre ellos y su función en otras especies vegetales, con diferentes historias evolutivas y, por tanto, estrategias propias de adaptación al déficit hídrico. Tal es el caso del Frijol (*Phaseolus vulgaris*), una planta de interés agrícola; es por ello que el objetivo principal de este trabajo fue identificar FTs tipo AP2 como parte inicial de un proyecto que pretende estudiarlos y determinar su función en la respuesta a la limitación de agua en esta especie vegetal. Como primer punto se hizo un análisis bioinformático de las secuencias de expresión (ESTs) disponibles para *P.vugaris* en la base de datos del NCBI, de donde se identificaron 30 secuencias únicas que presentan el dominio de unión a DNA tipo AP2; de estas, 15 corresponden a FTs tipo DREB. Se seleccionaron dos ESTs los cuales presentan un motivo característico de los FTs tipo DREB2, los cuales se ha propuesto que participan en la modulación de la respuesta a sequía. Por medio de PCR a partir de DNA genómico se logró obtener los genes completos, los cuales nombramos genéricamente como *PvERF001* y *PvERF002.* Un análisis de sus secuencias reveló que *PvERF001* y *PvERF002* se clasifican dentro del grupo A-5 de la subfamilia DREB de la familia AP2. Además *PvERF001* posee un dominio de represión en su extremo C-terminal, por lo que su papel durante la respuesta a estrés de tipo hídrico podría estar relacionada con la de un represor de la transcripción. También se determinaron los patrones de acumulación de los transcritos en plántulas y plantas adultas de frijol

sometidas a déficit hídrico, los datos obtenidos mostraron que los transcritos para los genes *PvERF001* y *PvERF002* se acumulan en planta adulta en respuesta a la sequía. Estos resultados sugieren que éstos FTs están implicados en la modulación de la respuesta de la planta al déficit hídrico.

Introducción.

Las plantas, desde el más insignificante de los vegetales hasta el mayor de los árboles, están siempre presentes a nuestro alrededor. Las plantas en general constituyen el soporte primordial sobre el que asienta la cadena trófica de los ambientes continentales y hasta marinos. Por si esto fuera poco, la existencia de las plantas nos permite además respirar el oxígeno de la atmósfera y acceder a gran parte de los constituyentes vitales de nuestra dieta, que nos proporcionan energía, fibra y vitaminas.

Con el creciente cambio climático, el calentamiento global y el incremento en las poblaciones humanas, el obtener cultivos viables que satisfagan las necesidades humanas se ha hecho cada vez es más difícil; por lo que se ha generado un interés tanto de agricultores como de investigadores para tratar de dilucidar los mecanismos por los cuales las plantas responden y se adaptan al estrés abiótico, con el fin de entender estos procesos para mejorar la productividad de las plantas en aquellos ambientes que no son los óptimos para su crecimiento y desarrollo.

Las aplicaciones de la biotecnología a la agricultura pueden ayudar a contender estos problemas, obteniendo cultivos que tengan una mayor tolerancia a periodos de sequía intensa o prolongada, manteniendo así la productividad de dichos cultivos; además de proveer considerables beneficios económicos y de crecimiento para países en desarrollo como México.

I. Las plantas bajo estrés.

Las plantas son organismos capaces de construir estructuras complejas a partir de moléculas orgánicas, utilizando como únicas fuentes de energía la luz solar y el CO_2, lo cual asegura su crecimiento y éxito reproductivo, esto bajo condiciones ambientales ideales. Sin embargo, las plantas constantemente están expuestas a condiciones adversas; por lo regular algo falta o sobra, a menudo varios factores bióticos y abióticos están lejos de lo ideal.

Las plantas viven frecuentemente en el límite de sus capacidades para sobreponerse a una o más situaciones adversas. Esto produce una tensión o estrés considerable en el organismo, el cual responde mediante varios mecanismos fisiológicos, celulares y bioquímicos, para superar, evitar o neutralizar dicho estrés (Bidwell, 1979; Bray, 1997).

La respuesta celular en la planta ocurre a nivel individual, y posteriormente de forma sinérgica en todo el organismo. La señal extracelular de estrés es percibida a nivel de membrana, por receptores, canales iónicos, cinasas semejantes a receptores (RLK) o histidinas cinasas (HK) y estos activan una cascada de señalización intracelular, la cual estimula la generación de segundos mensajeros como el Ca^{2+}, inositol fosfato (IP), especies reactivas de oxigeno (ROS) y ABA. La señal de estrés se transduce al núcleo para inducir a los genes de respuesta, cuyos productos eventualmente, le permiten una adaptación a la tolerancia al estrés de forma directa o indirecta (Mahajan, S. Y Tuteja, N. 2005), los cambios en la expresión génica, modifican el crecimiento, el desarrollo y eventualmente influyen en las capacidades reproductivas de las plantas (Bray y cols., 2000) (**Fig**. **1**).

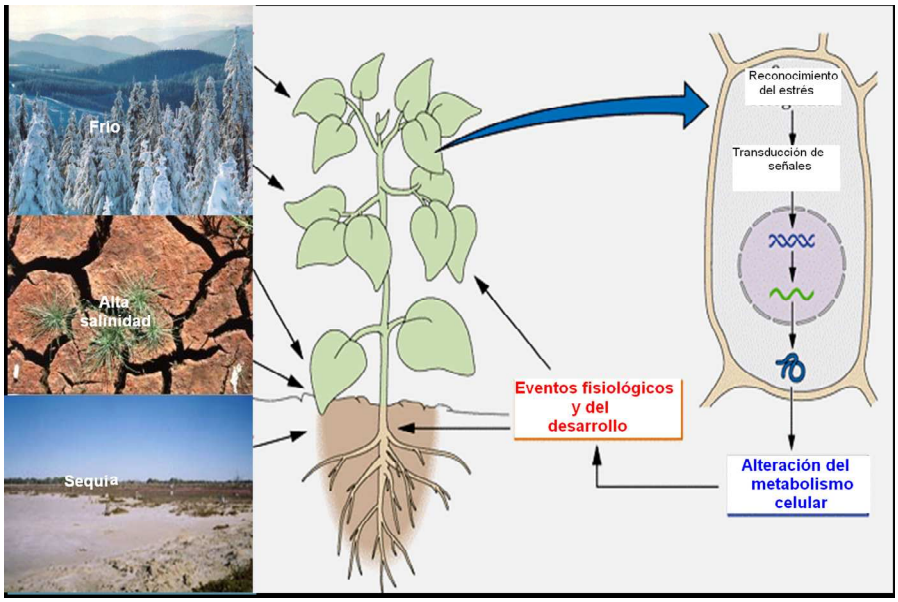


Figura 1. Respuesta de la planta al estrés abiótico.
El estrés esta constituido por señales ambientales que son recibidas y reconocerlas por la planta. Después del reconocimiento, la señal es transmitida a las células a través de toda la planta. La transducción de las señales ambientales da como resultado una alteración en la expresión génica a un nivel celular, la cual influye sobre el metabolismo y desarrollo de la planta. Modificado de Bray *et al*. (2000).

I.1. El efecto del estrés hídrico en la planta.

El déficit hídrico es uno de los tipos de estrés abiótico más comunes que las plantas enfrentan durante su ciclo de vida y que repercute directamente en su metabolismo y crecimiento. Se presenta cuando la tasa de transpiración excede a la toma de agua; basándonos en este hecho muchas condiciones ambientales provocan déficit hídrico, como una alta concentración de sal en el suelo, ya que esto hace más difícil que las raíces de las plantas puedan extraer el agua del medio ambiente; por otra parte las bajas temperaturas conducen a la deshidratación celular y al congelamiento del medio intracelular reduciendo la absorción y conducción del agua a nivel de la raíz. Como todo estrés causa múltiples efectos, los cuales tienen como consecuencia:

(a) la inhibición temporal de la tasa de crecimiento de los órganos aéreos
(b) el cierre de estomas, para disminuir la pérdida de agua,
(c) a nivel celular aumenta la concentración de solutos, por lo que ocurren cambios en la forma y el volumen celular,
(d) la pérdida de la turgencia,
(e) disminución del potencial hídrico,
(f) la disrupción de la integridad de las membranas
(g) la desnaturalización de proteínas, asociada a cambios conformacionales en algunas proteínas que afecta su función.

Una completa pérdida de agua da como resultado la desecación o deshidratación. La habilidad del rango de respuesta y sobrevivencia al déficit hídrico depende del mecanismo que integra la respuesta celular. Así las respuestas al déficit hídrico pueden ocurrir en unos cuantos segundos (cambios en el estado de fosforilación de una proteína) o en unos minutos u horas (cambios en la expresión génica) (Bray, 1997).

II. Genes inducidos durante el déficit hídrico

Los cambios en el metabolismo y desarrollo causados por el déficit hídrico se atribuyen generalmente a una alteración en la expresión génica, donde algunos genes se reprimen, y otros se inducen (Bray, 1997; Bray, 2000).

Seki y cols. (2001, 2002) utilizando la técnica de microarreglos, hicieron análisis de la expresión de genes bajo condiciones de déficit hídrico en *Arabidopsis*, y encontraron que hay genes que se inducen de manera específica durante esta condición, y sus productos se clasifican dentro de dos grupos; el primer grupo está compuesto por proteínas que probablemente funcionan en la tolerancia al estrés, tales como; proteínas de membrana que mantienen el movimiento de agua a través de las células (acuaporinas, transportadores); enzimas clave para la biosíntesis de osmolitos (prolina, betaina y azúcares); enzimas de desintoxicación celular o aquellas que mantienen los niveles normales del metabolismo (hidrolasas, catalasas, superoxido dismutasas, ascorbato peroxidasa, etc.), y otras proteínas que parecen estar implicadas en la protección de macromoléculas, como las proteínas **LEA** (del ingles **L**ate **E**mbryogenesis **A**bundant, proteínas abundantes de embriogénesis tardía), osmotinas, proteínas de anticongelamiento, chaperonas, proteínas que se unen al mRNA. (Cushman y Bohnert, 2000). El segundo grupo está integrado por proteínas involucradas en la regulación de las vías de transducción de señales y de la transcripción de los genes implicados en esta respuesta. En este grupo se incluyen varios **F**actores **T**ranscripcionales **(FT)** tipo MYC, MYB, NAC, DREB, etc. (Seki y cols*.,* 2003), lo que sugiere que varios mecanismos de regulación transcripcional están involucrados en las vías de transducción de señales durante este estrés y, además que estos FT pueden regular en conjunto o de manera separada a los genes involucrados, constituyendo una red compleja. Las otras proteínas pertenecientes a este segundo grupo son proteínas cinasas (MAP cinasa, CDP cinasa), fosfatasas, enzimas involucradas en el metabolismo de fosfolípidos; proteínas G y otras moléculas de señalización como calmodulina (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2006).

III. Regulación transcripcional de genes durante déficit hídrico

Después de que la célula vegetal percibe la pérdida de agua, un mecanismo de señalización es activado para inducir la expresión de algunos genes (Bray y cols., 2000). Los análisis moleculares muestran que son varios los sistemas regulatorios que están implicados en la expresión de los genes que se inducen bajo el déficit hídrico; diferentes sets de elementos que actúan en *cis* y en *trans* están involucrados en la regulación de la transcripción de la respuesta a dicho estrés. La región promotora de los genes que se inducen durante el déficit hídrico contiene elementos en *cis*, involucrados en la modulación de su expresión (Shinozaki y cols*.,* 2003); con los cuales interaccionan para formar el complejo de inicio de la transcripción en la caja TATA, río arriba de los sitios de iniciación transcripcional. El complejo de iniciación transcripcional activa a la RNA polimerasa II para que comience la transcripción de los genes de respuesta al déficit hídrico (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2005).

El análisis de los promotores de algunos de los genes que responden a estrés hídrico ha permitido obtener información sobre por lo menos cuatro sistemas regulatorios; en dos de ellos participa la fitohormona **ABA** (Ácido Abscísico)(Yamaguchi-Shinozaki, y Shinozaki, 2000)(**Fig.2**).

III.1. La fitohormona ABA.

ABA es un isopreno de 15 carbonos derivado de dos posibles vías, a partir del ácido mevalónico (AMV) o a partir de la degradación de ciertos carotenoides, ambas vías de síntesis se llevan a cabo en cloroplastos y otros plástidos (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2005; Bray *y* cols., 2000). ABA regula de forma negativa la gluconeogénesis e inhibe la conversión de lípidos en azúcares, además esta implicada en la regulación los procesos de crecimiento (Acevedo y cols*.*, 2005); es un mensajero endógeno del estrés biótico y abiótico (Hirayama, T., y Shinozaki, K. 2007). La respuesta a ABA induce una

redirección en la expresión génica, lo que gradualmente provoca latencia en yemas y semillas, senescencia en hojas, control en la transpiración, ya que actúa directamente sobre las células guarda para inducir el cierre de estomas durante el déficit hídrico. Diferentes tipos de estrés inducen la síntesis de ABA, es por ello que también se le considera una hormona de estrés en plantas (Swamy, P. y Smith, B. 1999).

Varias proteínas han sido reportadas para funcionar como posibles receptores de ABA, pero, hasta ahora se reconocen como candidatos posibles a la subclase de fosfatasas tipo 2, serina-treonina, dependientes de Mn^{2+} y Mg^{2+} (PP2Cs), cuyos prototipos son ABI1 y su homólogo estructural ABI2, estas proteínas interaccionan con las proteínas RCAR1, denominadas así por componentes regualatorios del receptor de ABA 1 (Ma, Y. y cols. 2009). Un piridil nitrógeno es necesario para la actividad de la pirobactina (PYR1), este compuesto, es un agonista de la señalización de ABA, ya que unido a esta inhibe a la PP2C (Park, S. Y cols. 2009).

El análisis de plantas de Arabidopsis afectadas en la sensibilidad a ABA (mutantes ***abi***) o en la producción de ABA (mutantes ***aba***), ha arrojado resultados muy informativos en la caracterización de la cascada de señalización mediada por ABA, demostrando que se requiere de ABA para la expresión específica de ciertos genes inducidos durante el estrés de tipo hídrico. En *Arabidopsis* se han caracterizado cinco mutantes insensibles a ABA exógeno, las mutantes se han denominado *abi1*, *abi2*, *abi3*, *abi4* y *abi5* respectivamente; en donde ABI4 y ABI5 son FT con dominios AP2 y bZIP respectivamente (Finkelstein y cols*.,* 1998; Finkelstein y Lynch., 2000).

III.2. Vía Dependiente de ABA

Como ya se mencionó, ABA regula la expresión de varios genes que participan en la tolerancia al déficit hídrico. El análisis de la región promotora de algunos de los genes que se activan durante el déficit hídrico como el de *RD29B* en *Arabidopsis* (Uno y cols., 2000*)*, el de *RAB16* en arroz (Mundy y cols., 1990),

y el *EM1* en trigo (Guiltinan y cols., 1990), ha permitido identificar un elemento regulatorio en *cis*, altamente conservado, denominado **ABRE** (del inglés **A**BA **B**inding **R**esponsive **E**lement o elemento de respuesta a ABA), el cual se define como una secuencia de 8 a 10 pares de bases (PyACGTGGC), con una secuencia central ACGT (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994). La secuencia o motivo ACGT se ha reportado en otros elementos regulatorios, como la caja G (CACGTG), la cual está implicada en la regulación de genes que responden a luz, auxinas, ácido jasmónico (**JA**) y ácido salicílico (**AS**) (Hong y cols., 1995; Lee y cols., 2006).

Para una activación transcripcional en respuesta a ABA, un solo elemento ABRE no es suficiente, en trigo se ha observado que la activación de los genes HVA1 y HVA2 requiere además del elemento ABRE, a dos elementos acopladores **CE1** y **CE2** (del inglés **C**oupling **E**lemet 1 y 2) (Shen y Ho., 1995); en *Arabidosis* se necesitan dos secuencias tipo ABRE para la expresión del gen *RD29B*, uno de estos elementos ABRE funciona como un elemento acoplador (Shen y cols., 1996., Uno y cols. 2000)(**Fig. 2**).

Utilizando el método de un híbrido de levadura, en *Arabidopsis* se han encontrado varios FTs que se unen a los elementos ABRE (Choi y cols., 2000). Estos FTs son del tipo bZIP, los cuales presentan un motivo básico de cierre de leucinas en el extremo N-terminal; y se han nombrado AREB (del ingles **A**BRE **B**inding o proteínas de unión a ABRE), o ABFs (del ingles **A**BRE **B**inding **F**actors o Factores que se unen a ABRE) (Uno y cols., 2000). Adicionalmente se ha mostrado que los AREBs/ABFs son regulados por fosforilación y desfosforilación, y éstos controlan la expresión de los genes que contienen elementos en *cis* tipo ABRE, como el gen *RD29B* (Fujita y cols., 2005).

Existen otro tipo de FTs como son los MYC (AtMYC2) y MYB (AtMYB2), los cuales son sintetizados después de la acumulación de ABA endógeno, estos factores reconcocen secuencias CANNTG (MYC) y C/TAACNA/G (MYB) y ayudan a la activación del gen *RD22* durante estrés por sequía (Abe y cols., 2003; Mahajan, S. Y Tuteja N. 2005) (**Fig. 2**). El FT AtMYC contiene un motivo helice-giro-helice-ZIP (bHLH-ZIP), se induce también por JA , y esta involucrado

en la regulación del crecimiento de raíces adventicias en presencia de luz (Lorenzo y cols., 2004; Yadav y cols., 2005).

En *Arabidopsis*, el gen *RD26* codifica para un FT tipo NAC; su expresión no sólo se induce por sequía, sino también por ABA y alta salinidad (**Fig. 2**). La proteína se localiza en el núcleo y su extremo C-terminal presenta actividad transcripcional; la sobre-expresión del gen *RD26* da un fenotipo de hipersensibilidad a ABA en plantas transgénicas; también se ha observado, mediante microarreglos, que en estas sobre-expresoras se inducen los genes *GLY* y *SAG13,* los cuales se activan por estrés biótico. En la mutantes de Arabidopsis afectadas en *rd26* hay una represión de los genes GLY y SAG13 (Fujita y cols., 2004).

III.3. Vía Independiente de ABA

Varios genes que se inducen durante el déficit hídrico y bajas temperaturas, no se inducen por ABA, como *RD29A*, *LTI78*, *COR78*, *KIN1*, *COR47* (Yamaguchi-Shinozaki, K y Shinozaki K.1993. B; Skriver y Mundy, 1990). El análisis de la región promotora del gen *RD29A* de *Arabidopsis* ha permitido identificar un elemento en *cis* que presenta una secuencia conservada de 9 pares de bases (TACCGACAT), dicho elemento recibe el nombre de elemento **DRE** (del ingles **D**rought **R**esponsive **E**lement o elemento de respuesta a deshidratación) (Yamaguchi-Shinozaki, K y Shinozaki, K. 1994). En la región promotora de los genes *KIN1*, *RD17*, *KIN2* se han encontrado elementos que actúan en *cis* similares a DRE, dichos elementos se han nombrado CRT (C-repetidos) o LTRE (del ingles **L**ow **T**emperature **R**esponsive **E**lement o elementos que responden a baja temperatura), según sea el caso; ambos contienen el motivo A/GCCGA. Es por esto que se ha propuesto que el motivo central del elemento DRE es CCGAC (Baker y cols., 1994; Stockinger y cols., 1997). Se ha determinado que una sola copia del elemento DRE es suficiente para la expresión de los genes que responden a sequía por una vía independiente de ABA, a diferencia de los ABRE, aparentemente los DRE no

requieren de otros elementos para su función (Yamaguchi-Shinozaki, K y Shinozaki, K. 1994).

Mediante el método de un híbrido en levadura, se han identificado las proteínas que se unen al elemento DRE/CRT, estas proteínas se han denominado **CBF/DREB** (del ingles **C**-repeat **B**inding **F**actor/**B**inding **D**RE o proteínas de unión al factor CRT, o proteínas de unión a DRE). Las proteínas DREB contienen un dominio llamado AP2, que es capaz de unirse a DNA, dicho dominio también se encuentra presente en proteínas tipo **ERF** (del ingles **E**thylene **R**esponsive **F**actor o elemento de respuesta a etileno)(Stockinger y cols.,1997; Liu y cols.,1998)(**Fig. 2**).

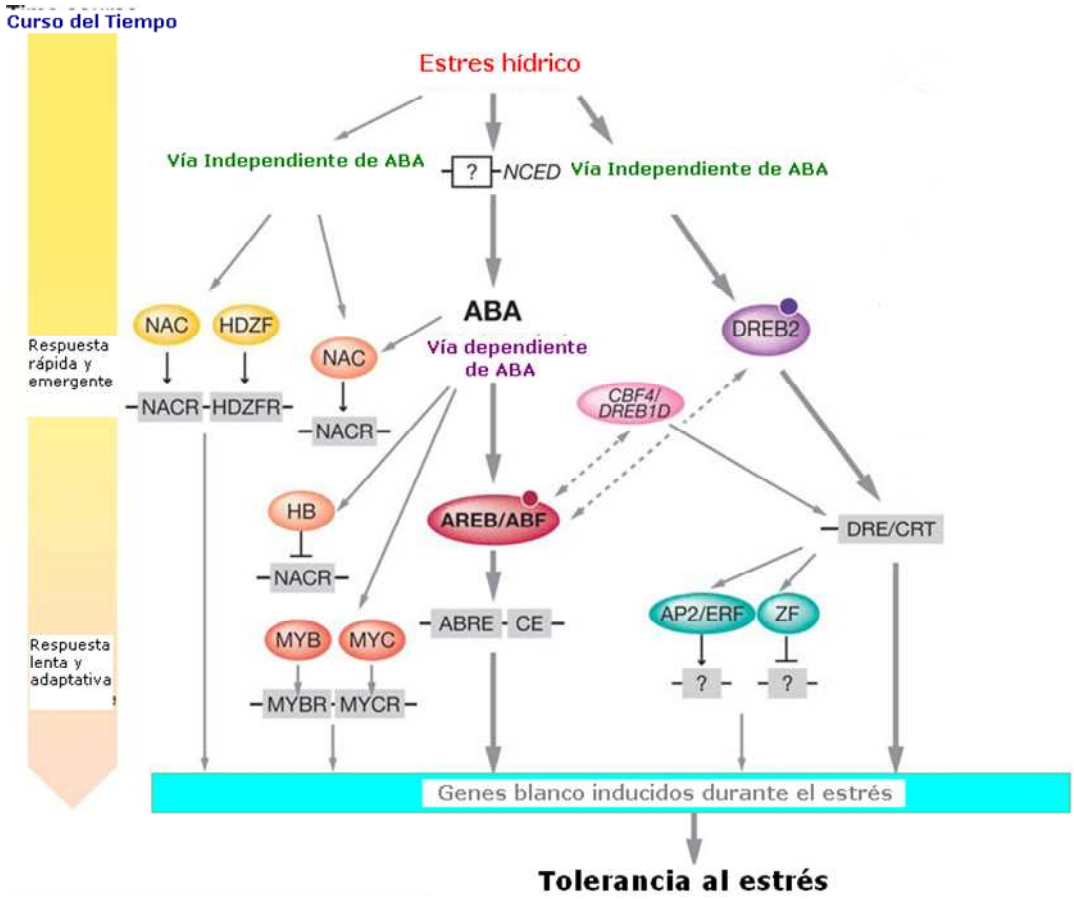


Figura 2. Vías de la regulación transcripcional en *Arabidopsis* durante el estrés hídrico: vía independiente de ABA y vía dependiente de ABA. Los factores transcripcionales que controlan la expresión de los genes que se inducen se muestran en elipses, los elementos involucrados que actúan en *cis* se muestran en rectángulos grises; los círculos pequeños en los factores transcripcionales indican modificaciones en respuesta de señales de estrés para su activación, tales como fosforilaciones. Modificado de Yamaguchi-Shinozaki, K y Shinozaki, K (2006).

IV. Factores Transcripcionales

La regulación de la expresión génica es central para controlar un sin fin de procesos biológicos a nivel molecular. Uno de los puntos importantes es la regulación a nivel transcripcional en donde intervienen algunos FT.

Los FT son proteínas modulares que presentan un dominio de unión a DNA, dominios de interacción con otras proteína y contienen al menos una una señal tipo NLS (señal de localización nuclear). El dominio de unión a DNA interacciona con los elementos regulatorios en *cis* de sus genes blanco activando o reprimiendo la transcripción, los dominios de interacción con otras proteínas, facilitan la formación de complejos de transcripción, por medio de la oligomerización entre los FT y otros reguladores.

Los FT se clasifican en varias familias, basándose en el dominio de unión a DNA (Wray y cols*.,* 2003; Riechman y cols., 2000).

IV.1. Factores transcripcionales involucrados en la regulación del déficit hídrico

Se han identificado factores transcripcionales que activan la transcripión de genes durante la respuesta al déficit hídrico. La fitohormona ABA modula la expresión de varios FTs en esta respuesta, un ejemplo de ello, comprende al sistema bZIP/ABRE y otro al sistema MYC/MYB (Uno y cols., 2000), en donde algunos de sus miembros participan durante la respuesta al déficit hídrico. Otros FTs que son activados durante este tipo de estrés, por la vía independiente de ABA son los FT de la familia AP2 de los cuales los mejor caracterizados en la respuesta a sequía en *Arabidopsis* son los de tipo DREB. (Liu y cols., 1998; Abe y cols., 1997).

IV.2. Familia de Factores Transcripcionales tipo AP2

La familia de factores transcripcionales tipo AP2 se caracteriza porque sus miembros contienen un dominio de unión a DNA altamente conservado, denominado AP2, el cual está formado por aproximadamente 60-70 aminoácidos, dividido en dos módulos, uno de 20 aminoácidos básicos e hidrofílicos en la región amino (elemento YRG) y una secuencia en el extremo carboxilo que puede formar una α-hélice anfipática (elemento RAYD) (Okamuro y cols*.,* 1997).

Los factores transcripcionales tipo AP2 constituyen una familia génica que está involucrada en una gran variedad de mecanismos de regulación durante el ciclo de vida de la planta. Basados en el número de dominios AP2 y la función de los genes, la familia de proteínas AP2 está dividida en cinco clases denominadas: APETALA2, ERF, DREB, RAV y otros. (Sakuma y cols., 2002; Nakano y cols*.,* 2006). Las proteínas APETALA2 contienen dos dominios AP2 y estos FT participan en la regulación de procesos de desarrollo (Elliot y cols., 1996; Boutilier y cols*.,* 2002). Las proteínas RAV contienen un dominio AP2 y un dominio B3, tienen diferentes funciones biológicas, recientemente se ha encontrado que miembros de la familia RAV están involucrados en la vía de respuesta del etileno, y en la respuesta a los estreses biótico y abiótico (Alonso y cols., 2003; Sohn y cols*.*, 2006). Las proteínas ERF contienen un solo dominio AP2, los miembros de la subfamilia DREB juegan un papel importante en la respuesta al estrés abiótico, ya que son los que reconocen el elemento de respuesta a deshidratación (DRE) (Yamaguchi-Shinozaki, K y Shinozaki, K. 1994).

Sakuma y cols. (2002) encontraron que el genoma de *Arabidopsis* contiene 144 genes que codifican para proteínas tipo AP2: 17 pertenecen a la familia APETALA2, 6 miembros a la familia RAV, 65 a la subfamilia ERF, 55 a la subfamilia DREB y un gen cuya clasificación no entra en ninguna subfamilia (**Fig. 3**).

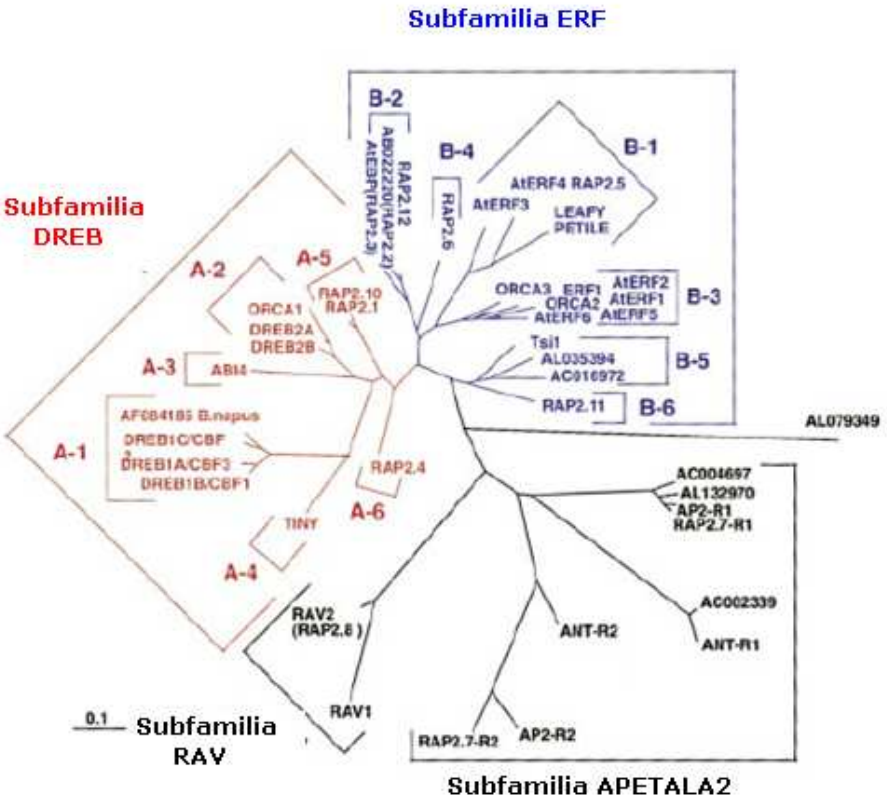


Figura 3. Árbol filogenético de los factores transcripcionales tipo AP2 de *Arabidopsis thaliana*. Se muestran las 5 subfamilias (DREB, ERF, RAV, APETALA2 y otros), el grupo A (A1-A6), muestra la división de la familia DREB, el grupo B (B1-B6), muestra la división del subgrupo ERF. Modificado de Sakuma y cols. 2002.

IV.2.1 La subfamilia ERF

La subfamilia ERF contiene los FT relacionados con la respuesta al etileno, algunos de sus representantes se unen específicamente a la caja GCC, la cual está presente en la región promotora de genes inducidos por etileno en respuesta a patogénesis (Fujimoto y cols., 2000). Además estas proteínas se caracterizan por presentar un motivo compuesto por una alanina en la posición 14 del dominio de unión a DNA (**A14**) y un ácido aspártico en la posición 19 (**D19**) (**Fig. 4**). Sakuma y cols. (2002) han clasificado a los genes que codifican para proteínas tipo ERF en el grupo B, y éste a su vez se divide en seis pequeños subgrupos, que se basan en las identidades de la secuencia del dominio de unión a DNA, los cuales se llaman B1, B2, B3, B4, B5 y B6. Los

subgrupos, B1, B2 y B3, incluyen genes que codifican proteínas que se unen específicamente a la caja GCC, tales como AtERF1, AtERF2, entre otras como los AtRAP2.2; el subgrupo B4 contiene a las proteínas tipo RAP 2.6, y los subgrupos B5 y B6 contienen a las proteínas tipo RAP2.11, las cuales no presentan alanina en la posición 14. La mayoría de estos FT no ha sido caracterizado (Liu y cols., 1998; Nakano y cols., 2006; Stockinger y cols., 1997).

IV.2.2. La subfamilia DREB

La subfamilia DREB presenta un motivo característico compuesto por un residuo de valina en lugar de alanina en la posición 14 del dominio de unión a DNA (**V14**) y un residuo de ácido aspártico en la posición 19 (**D19**) (**Fig. 4**). Algunos FT de la subfamilia tipo DREB juegan un papel importante durante el estrés abiótico activando genes de respuesta a dichos estreses (Sakuma y cols. 2002; Liu y cols., 1998.), Sakuma y cols. (2002) clasificaron a las proteínas tipo DREB de *Arabidosis*, basándose en las semejanzas del dominio de unión a DNA (AP2), en seis clases o grupos: A1, A2, A3, A4, A5 y A6. El grupo A1 y A2 incluyen a la familia de genes DREB1 y DREB2, respectivamente, cuyos productos se unen al elemento *cis* DRE/CRT. El grupo A3 esta integrado por un solo miembro que es ABI4. El grupo A4 contiene 16 genes, incluyendo a TINY; el grupo A-5 contiene 16 genes incluyendo a RAP2.1, RAP2.9, y RAP2.10. Los miembros de los grupos A4 y A5 juegan un papel esencial en la expresión de los genes que responden a sequía, baja salinidad y estrés hídrico. El grupo A6 contiene nueve genes incluyendo RAP2.4, cuya activación es dependiente de ABA (Sakuma y cols., 2002; Nakano y cols., 2006).

La especificidad de unión de las proteínas DREB1 y DREB2 ha sido analizada por movilidad en gel, y se ha encontrado que la valina en la posición 14 dentro del AP2 y el ácido glutámico en la posición 19, juegan un papel importante para la especificidad de unión a DNA y para la actividad de las mismas (Liu y cols., 1998).

Se ha determinado que los genes tipo DREB1 contienen una secuencia de aminoácidos conservados en su dominio AP2; entre la valina 14 y el ácido glutámico en la posición 19, poseen el motivo C/SEV/LR; éste juega un papel importante en el reconocimiento de los sitios de unión a DNA con las proteínas DREB1 y DREB2 (Sakuma y cols., 2002) (**Fig. 4**). En *Arabidopsis* se han caracterizado por lo menos seis proteínas tipo DREB1 (DREB1A, DREB1B, DREB1C, DREB1D, DREB1E y DREB1F). El análisis de patrones de la cumulación de transcritos indica que la expresión de DREB1A, DREB1B y DREB1C se induce durante estrés por baja temperatura en hojas y raíces, y regulan la expresión de genes que se inducen por bajas temperaturas a través del elemento en *cis* DRE (Liu y cols., 1998). De igual manera se ha sugerido que las proteínas DREB1D, DREB1E y DREB1F se expresan en respuesta al estrés salino en raíces (Sakuma y cols*.,* 2002). En *Arabidopsis,* la sobre-expresión del gen *DREB1B* bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) da como resultado alta tolerancia a estrés por frío; mientras que la sobre-expresión del gen DREB1A bajo el control del promotor CaMV35S incrementa la tolerancia a la sequía, alta salinidad y frío; en ambos casos las plantas transgénicas inducen una elevada expresión de sus genes blanco como son: las proteínas tipo LEA, RD29A, LTI78, COR78, entre otros. Sin embargo las plantas sobre-expresoras presentan un fenotipo enano (Liu y cols., 1998; Liu y cols*.,* 1999).

Durante la percepción de la señal por bajas temperaturas, un activador transcripcional tipo MYC-bHLH, denominado ICE1 (por inductor de DREB1), es activado mediante sumoilación, la cual se lleva a cabo por la proteína SIZ1. Al ser sumoilado ICE1, se une al elemento en *cis* tipo MYC (CANNTG) que se encuentra en el promotor del DREB1A y así se activa su expresión, seguido de ésto se induce la expresión del regulón DREB1 y una de las respuestas que confiere tolerancia a frío (Chinnusamy y cols., 2003; Lee y cols., 2005; Miura y cols., 2007).

Los genes tipo DREB2 poseen una secuencia de aminoácidos conservada en el dominio de unión a DNA, entre la valina 14 y el ácido glutámico

19, este motivo (VAEIR) determina la especificidad de unión de las proteínas DREB2A a la secuencia DRE (Sakuma y cols., 2002) (**Fig. 4**).

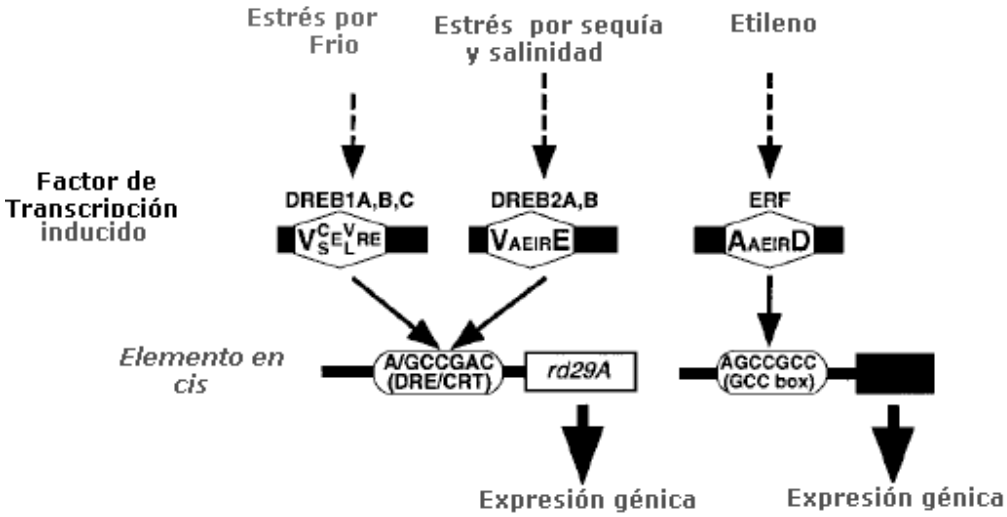


Figura 4. Modelo propuesto para la transducción de señales mediadas por las proteínas DREB y ERF. Las proteínas DREB1 se unen al elemento DRE, mediante el motivo V/CS/E/VL/RE y así regulan la expresión de los genes que responden a estrés por frío. Las proteínas DREB2 también se unen al elemento DRE mediante el motivo VAEIRE; y activan la expresión de los genes involucrados en estrés de tipo hídrico y salino; mientras que las proteínas ERF se unen a la caja GCC y están involucradas en la expresión de genes que responden a etileno. Modificado de Sakuma y cols. 2002

En *Arabidopsis* la expresión de las proteínas tipo DREB2 (DREB2A y DREB2B) es inducida por salinidad y deshidratación. La sobre-expresión de la proteína DREB2A y DREB2B en plantas transgénicas de *Arabidopsis* bajo el control del promotor 35SCaMV, no muestra una tolerancia a estrés por sequía, y las sobre-expresoras presentan un fenotipo enano. En *Arabidopsis* se ha detectado la expresión del DREB2A bajo condiciones óptimas de crecimiento, existe un dominio de “regulación negativo” en la proteína DREB2A, la remoción de esta región transforma a DREB2A en una forma constitutivamente activa DREB2A-CA. En *Arabidopsis* la sobre-expresión de DREB2A no sólo induce la expresión de genes implicados en la respuesta a sequía; si no que también a aquéllos que se inducen durante choque térmico (Sakuma y cols., 2006). Además, la proteína DREB2A no es estable, mientras que la truncada sí lo es. Bajo condiciones óptimas de crecimiento, la proteína DREB2A se expresa a niveles bajos; así que para prevenir la activación de la respuesta a estrés en

ausencia de sequía, esta proteína es reconocida y ubiquitinada por las proteínas DRP1 y DRIP2 (proteínas que interaccionan con DREB2A); este complejo es llevado al proteosoma 26S para su degradación. En cambio, en condiciones de sequía, es posible que los procesos de ubiquitinación y proteólisis sean bloqueados, así bajo condiciones de estrés, las plantas serian capaces de adquirir una cantidad suficiente de DREB2A para activar la expresión de los genes río abajo y producir la respuesta a estrés (Qin y cols., 2008).

V. Frijol

El frijol (*Phaseolus vulgaris*) es una de las leguminosas que más se consume en el mundo, principalmente en América Latina, África y Asia; ya sea como grano maduro, o como vegetal. *P. vulgaris llega a* proveer más del 70% de la dieta proteica para la gente de algunos países en vías de desarrollo. Desafortunadamente con el incremento en el cambio climático (aumento de temperatura, sequía, etc.) los rendimientos de su producción son limitantes; este es un reto que la biotecnología puede abordar para lograr el mejoramiento de este cultivo.

P.vulgaris posee características deseables que lo hacen un candidato idóneo para ser un organismo modelo; ya que presenta un ciclo de vida corto, aproximadamente de 80 días, es una herbácea por lo que puede crecer como mata o rastrera, además por su origen mesoamericano, se cuenta con abundantes datos fisiológicos y de campo; posee un germoplasma diverso, un genoma relativamente pequeño, aproximadamente de 450-650 Mpb, y es un diploide “perfecto”(2n=2x=22) (Bennett y Leitch, 1995).

V.1. Proyectos genómicos

Hasta el momento hay varios proyectos enfocados a la genómica de dos especies de frijol: *P. vulgaris* y *P. coccineus*. En el CIAT (Centro Internacional

de Agricultura Tropical) existe una colección de especies de *Phaseolus*. En este centro estudia el germoplasma e identifica caracteres que pudieran ser útiles, mediante el uso de marcadores moleculares.

Aunque hasta ahora no se cuenta con la secuencia completa del genoma de frijol, existen reportadas varias secuencias de ESTs, las cuales, aunque limitantes han permitido ciertos avances en la búsqueda de genes de interés.

En el 2004, un proyecto de la Universidad de Michigan (EUA), en colaboración con la universidad ESALQ (Sao Paulo Brasil) liberaron 575 ESTs de *P. vulgaris* al Centro Nacional para la Información Biotecnológica (NCBI, por sus siglas en inglés) todos ellos provenientes de plántulas, hojas y embriones inoculados y no inoculados con *C. lindemuthianum*, un hongo patógeno (Melotto, y cols., 2005).

En el 2005 el Centro de Ciencias genómicas (CCG) de la Universidad Nacional Autónoma de México, reportó la secuencia del genoma completo del cloroplasto de *P. vulgaris*, y liberó al NCBI miles de ESTs, los cuales incluyen transcritos de nódulo (Ramírez y cols., 2005).

Además, como parte de la iniciativa de Phaseomics se obtuvo un grupo de ESTs provenientes de diferentes tejidos de planta como raíz, nódulos, hojas y otras condiciones experimentales. (Broughton, y cols., 2002).

Antecedentes

Las vías que involucran a las proteínas tipo DREB juegan un papel importante en la regulación de la respuesta a estrés de tipo hídrico; sin embargo aún faltan piezas para entender el papel específico que juegan dichas proteínas. Se han encontrado ortólogos de los genes DREB1 y DREB2 de *Arabidopsis* en plantas como: arroz (OsDREB1A), maíz (ZmDREB1) y soya (GmDREB2). La sobre-expresión de las proteínas OsDREB1A, ZmDREB1 y GmDREB2 en plantas de *Arabidopsis* da como resultado plantas más tolerantes a sequía y a bajas temperaturas (Dubouzet y cols., 2003; Marocco y cols., 2005; Chen y cols., 2007).

Se han aislado tres genes homólogos a DREB en soya (*Glicine max*): GmDREBa, GmDREBb y GmDREBc, el análisis de un híbrido en levadura reveló que los tres se unen al elemento DRE, y la transcripción de los tres genes responde a estrés por sequía en hojas y plántulas (Li y cols*.,* 2005*).* Recientemente, un nuevo FT tipo DREB2 fue aislado de *G.max*. En base a su dominio AP2, este factor fue clasificado en el subgrupo A5. Su expresión se induce por sequía, salinidad, ABA y bajas temperaturas. La sobre-expresión de este gen bajo el control del promotor 35S en *Arabidopsis* mejora la tolerancia a sequía y frío y no muestra fenotipos negativos, como plantas enanas (Chen, y cols*.* 2007).

En soya, se han identificado 98 unigenes que poseen el dominio AP2, el análisis de expresión de estos 98 unigenes mediante RT-PCR, reveló que nueve se activan durante sequía; así mismo la sobre-expresión de dos de estos nueve genes en plantas de Tabaco confiere tolerancia a sequía, y a estrés salino (Zhang, G. y cols., 2008).

Justificación.

A partir de lo anterior, tanto la propuesta de la existencia de factores transcripcionales tipo DREB de la familia AP2 encontrados en diversas especies de plantas como su relación para controlar la regulación de muchos genes que responden a sequía, nos hace pensar que estos FT son buenos candidatos, para que mediante su manipulación se puedan crear plantas transgénicas más tolerantes a sequía e incluso a frío.

En base a esto se propuso realizar la identificación y caracterización de los factores transcripcionales involucrados en la respuesta adaptativa a la sequía en plantas de interés agrícola para México, como lo sería el frijol (*P. vulgaris).*

Hipótesis

Ya que los Factores de Transcripción de la Familia AP2 tipo DREB se han encontrado en diferentes especies, puede esperarse que estos factores existan en *Phaseolus vulgaris* y estén involucrados en la vía de respuesta al déficit hídrico.

Objetivo general

Identificar y caracterizar los factores transcripcionales tipo AP2 involucrados en la respuesta a déficit hídrico en *Phaseolus vulgaris*.

Objetivos particulares

(a) Identificar factores transcripcionales tipo AP2
(b) Clonar algunos factores transcripcionales tipo DREB
(c) Determinar los patrones de acumulación de algunos de los transcritos de los factores transcripcionales aislados de *P. vulgaris* a partir de plantas sometidas a déficit hídrico.

Material y métodos.

I. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) variedad negro Jamapa. En algunos tratamientos de déficit hídrico se utilizaron plántulas de frijol, las cuales se germinaron por 4 días en una bandeja con un ambiente húmedo a 28ºC (Colmenero-Flores y cols., 1997), posteriormente se seleccionaron plántulas de tamaño uniforme y se transplantaron a vermiculita conteniendo diferentes cantidades de agua. En la condición control se añadieron 5 ml de agua por gramo de vermiculita, mientras que en la condición de déficit hídrico la vermiculita contenía 1/12 de agua de la condición control (0.4 ml de agua/g de vermiculita). Las plántulas se crecieron en la obscuridad a 28ºC y se cosecharon a las 0.5, 3.0, 6.0 y 18.0 horas. Las plántulas se cosecharon sin cotiledones en N_2 líquido y almacenadas a -80º C hasta su uso.

Para la obtención de plantas maduras en condiciones control y de déficit hídrico se utilizaron plantas de frijol de 25 días crecidas en macetas en el invernadero bajo condiciones óptimas de riego (Campos y cols., 1987); posteriormente, a un grupo de plantas se les impuso déficit hídrico simplemente dejando de regar hasta que aparecieron síntomas de marchitamiento (alrededor de una semana), mientras en el grupo control se siguieron manteniendo las condiciones de riego óptimo. Se cosecharon hojas y raíces de ambos grupos en N_2 y se almacenaron a -80º C.

II. Aislamiento de RNA y análisis por “Northern”

Se aísló RNA total de plantas usando el método de "fenol caliente" descrito por Pawloski y cols. (1994). El RNA obtenido se disolvió en formamida y se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm. El RNA obtenido se analizó por experimentos tipo "Northern", el RNA (10 µg) se separó por electroforesis en geles al 1% de agarosa y 2.2% de formaldehído (Sambrook y cols., 1989.) Posteriormente, se llevó a cabo la transferencia por capilaridad en seco (Kempter y cols., 1991), en membranas de nylon Hybond-N+ (Amersham, UK). Después de la transferencia, la membrana se fijó con calor en un secador de geles a 80º C por una hora.

II.1. Condiciones de hibridación.

Las condiciones de hibridación y lavados subsecuentes se llevaron a cabo en condiciones estándar, como lo describen Church y Gilbert (1984). La membrana se prehibridó en buffer PSE (SDS 7%, fosfato sódico 0.3M de pH 7.2, EDTA 1mM) durante 30 min. a 65º C, después se hibridaron con las sondas de DNA (PVERF001 y PVERF002) marcadas con α ^{32}P-dCTP. La hibridación se llevó a cabo durante toda la noche a 65º C. Posteriormente, las membranas se lavaron 4 veces con la solución de lavado (SSC2x, SDS 1%), durante 15 minutos a 65º C. Las membranas fueron expuestas a películas Kodak para uso médico de rayos-X (MXB) dentro de cassettes con pantalla intensificadora a -70º C.

II.2. Marcaje de la sonda

Los fragmentos de DNA de interés (PvERF001 y PvERF002) se marcaron radioactivamente usando el método descrito por Feinberg y Vogelstein (1983) utilizando α ^{32} P-dCTP. El método se basa en la utilización de una mezcla al azar de hexanucleótidos que actúan como iniciadores de la replicación usando el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *Escherichia coli*, lo que da como resultado la incorporación de nucleótidos radioactivos en la sonda.

III. Obtención de DNA genómico

Para la obtención de DNA genómico de frijol se usó el método descrito por Edwards y cols. (1991). Se utilizaron fragmentos de hojas de aproximadamente 0.5 cm^2, los fragmentos se molieron en un mortero con 400 µl de buffer de extracción (Tris 200 mM de pH 8.0, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5%), la mezcla obtenida se centrifugó 1 min., se tomaron 300 µl del sobrenadante y este se precipitó con 300 µl de isopropanol por 2 min. a temperatura ambiente. Se colectaron los ácidos nucleicos por centrifugación a temperatura ambiente por 5 min., la pastilla obtenida se lavó con etanol al 70%,

se secó en el “speed-vac” y, finalmente, se resuspendió en 25 µl de agua, se usaron 2.5 µl del DNA obtenido para cada reacción de PCR.

III.1. Clonación de productos obtenidos por PCR

Para la clonación de los productos obtenidos por PCR utilizando la enzima *Taq* polimerasa, se utilizó el sistema de clonación TOPO (invitrogen, USA) siguiendo las indicaciones del proveedor. El vector usado fue el PCR® 2.1 TOPO®. Este vector contiene resistencia a kanamicina y ampicilina, y sitios de reconocimiento de corte para diferentes enzimas de restricción: *Eco*RI, *Eco*RV, *Not I, Hind* III, *Kpn* I (**Fig. 5**).

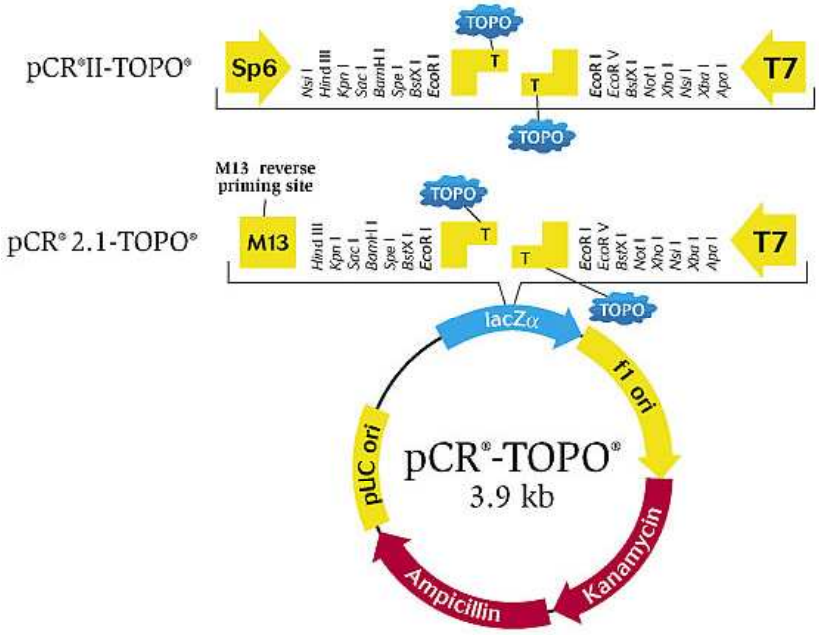


Figura 1. Esquema del vector de clonación PCR® 2.1 TOPO®. El sitio de clonación lac Zα se marca en azul, se indican algunos de los sitios de restricción del “polilinker”, también se muestran los diferentes sitios de unión para los diversos “primers”; las flechas rojas indican los genes de resistencia contenidos en dicho plásmido. Tomado de *Invitrogen, USA, 2006.*

III.2. Transformación y selección de plásmidos recombinantes.

Terminada la reacción de TOPO se le añadieron 200 µl de células quimio-competentes XL-blue (Sambrook y cols., 1989), esta mezcla se sometió a congelamiento en nitrógeno líquido y posterior descongelamiento a 37º C, dos veces. Posteriormente se le añadieron 800 µl de medio LB líquido y las

células se incubaron a 37º C por 20 minutos. Transcurrida la recuperación de las células, éstas se concentraron por centrifugación en 200 µl de medio LB, después se dispersaron en cajas de Petri conteniendo kanamicina 50 g/µl. Se seleccionaron alrededor de 18 colonias por cada reacción de TOPO y se crecieron en 5 ml de LB con kanamicina, los cultivos se incubaron con agitación continua a 37º C toda la noche. Al día siguiente se extrajo el plásmido por medio de la técnica de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979). El plásmido obtenido se digirió con la enzima *Eco*RI y se analizo en geles de agarosa al 2% en buffer TBE (Sambrook y cols., 1989). Los plásmidos recombinantes que contenían el fragmento de PCR fueron sometidos a una purificación adicional usando el sistema comercial QIAprep Spin miniprep (QIAGEN, Maryland, USA). Posteriormente, el DNA fue secuenciado en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología (UNAM) para determinar su identidad.

IV. Obtención de los genes

IV.1. RACE 3'

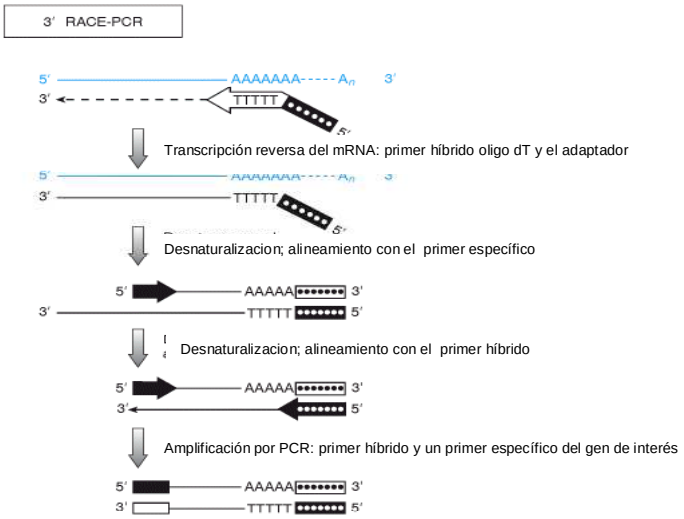
Para obtener la secuencia completa del gen PVERF001 se amplificó el extremo 3' faltante mediante la técnica de RACE 3' (del ingles Rapid Amplification of cDNA Ends 3'.). La técnica del RACE 3' se basa en la PCR para amplificar el extremo 3' faltante a partir de cDNA, además usa la peculiaridad de los mRNAs de tener una cola de poliA en el extremo 3' (**Fig. 6a**), por lo cual la PCR se realiza entre un oligonucleótido interno y un oligonucleótido compuesto de timinas (oligo dT) (Frohman *y cols*., 1988; Loh *y* cols., 1989; Ohara y cols., 1989).

Utilizando la secuencia del EST PvER001 se diseñó un oligonucleótido interno Aa.F (**Tabla 1**), el cual se utilizó junto con el oligonucleótido universal dT para amplificar el extremo 3' faltante. Como templado se utilizaron 50 ng/µl de un banco de cDNA obtenido de plántulas de frijol expuestas a déficit hídrico, las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 35 ciclos (94º C, 30 seg; 39º C, 30 seg; 72ºC, 1 min). Se obtuvo un fragmento de 1000 pb, que fue aislado por el método de Geneclean (Qiagen), posteriormente se clonó utilizando el vector PCR® 2.1 TOPO®, la clonación de los productos se verifico mediante

digestiones con *Eco*RI (**Fig.6b**). Posteriormente se comprobó la identidad de los productos obtenidos mediante secuenciación.

Nomenclatura	Oligonucleótidos 5'---->3'
a.Forward	GGT AGT AGG TAG GTG TAG
a.Reverse	GGG TTT AGG ATA CTC GTT C
b.Forward	GAT TGC GAA GAA GAT AAG
b.Reverse	GAT CGA CAT GGA TTC ATA TC
Aa.F	GTG GCG GAG ATT AGA GAG
Aa.com	AAA GGA GGA GGT TGA AGC C
GSP1	GAG CGG AAG GGC CTC TGA GGT AGA AG
GSP2	TGG ACC TCT TGT TGG GCT CTC TAA TC
AP1	GTA ATA CGA CTC ACT ATA GGG C
AP2	ACG CGT GGT CGA CGG CCC GGG CTG G

Tabla 1 . Oligonucleòtidos diseñados y utilizados en los diferentes experimentos de PCR hechos durante todo el anàlisis



b)

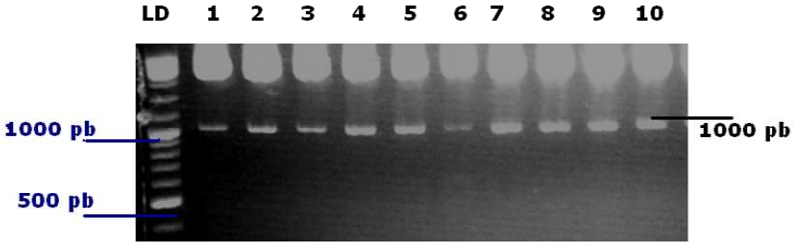


Figura 2. Técnica del RACE 3' empleada para obtener el extremo 3' faltante del gen PvERF001

a) Esquema general de la técnica RACE 3'. El primer paso de esta técnica consiste en una transcripción inversa para producir cDNA; durante este proceso una porción desconocida del extremo 3' faltante se copia utilizando un oligonucleótido específico. La PCR se utiliza para amplificar el extremo 3' faltante, para ello se utilizan dos oligonucleótidos: uno en sentido y uno antisentido complementario a la secuencia.

b) Digestión de los plásmidos PCR® 2.1 TOPO® con la enzima *Eco* RI, dichos plásmidos contienen el fragmento amplificado por RACE 3'. De la digestión se obtuvieron fragmentos de 1000 pb. LD indica el marcador de peso molecular; los números en la parte anterior indican el número de plásmido con el inserto.

IV.2. Obtención de la región promotora del gen *PvER001*.

Para obtener la región promotora del gen *PvER001* se utilizó el sistema de Genome Walker (GW) (Clontech, Palo Alto, CA, USA). El método de GW es un sistema de identificación de regiones río arriba de una secuencia de cDNA conocido, que se basa en el uso de dos ciclos continuos de PCR (PCR primario y PCR secundario) para aislar la región río arriba de la región conocida de cDNA. Este método consiste en lo siguiente: como primer paso se construyó una biblioteca digiriendo el DNA genómico con 4 enzimas diferentes, en donde el producto de las digestiones queda con extremos romos, ya que después cada fragmento se liga con los adaptadores específicos (AP1 y AP2, ver **Tabla 1**) provistos por el Kit del GW. El PCR primario utiliza el adaptador externo AP1 provisto por el "kit", y el oligonucleótido específico interno GSP1 provisto por el investigador. El producto del PCR primario es diluido y se utiliza como templado para el PCR secundario, que utiliza el segundo adaptador externo AP2 y el segundo oligonucleótido específico GSP2 (**Fig. 7**). Los bancos usados en este trabajo fueron hechos por el M. en C. Gabriel Guillen y el Dr. Federico Sánchez del Instituto de Biotecnología a quienes agradecemos su amabilidad al permitirnos usarlos.

Se usaron cuatro bancos de DNA genómico de frijol hechos con las enzimas *Dra*I, *Eco*RV, *Pvu*II y *Stu* I, los cuales se digirieron con estás enzimas y sus productos se ligaron con los adaptadores provistos por el "kit". Se utilizó cada biblioteca como templado y a partir de la secuencia del gen PvERF001 se diseñaron los oligonucleótidos internos específicos, el GSP1 y GSP2 (**Tabla 1**), los cuales se utilizaron junto con los adaptadores externos el AP1 y AP2 (**Tabla 1**), provistos por el Kit del GW para las dos reacciones de PCR., las cuales se llevaron a cabo bajo las siguientes condiciones.

PCR primario: 7 ciclos (94º C, 25 seg; 72ºC, 3 minutos); 32 ciclos (94º C, 25 seg; 67º C, 3 min; 1 ciclo 67º C, 7 min)

PCR secundario 5 ciclos (94º C, 25 seg; 72ºC, 3 minutos); 20 ciclos (94º C, 25 seg; 67º C, 3 min; 1 ciclo 67º C, 7 min)

Los fragmentos obtenidos fueron clonados mediante el sistema PCR® 2.1 TOPO® y los plásmidos recombinantes fueron secuenciados para determinar su identidad.

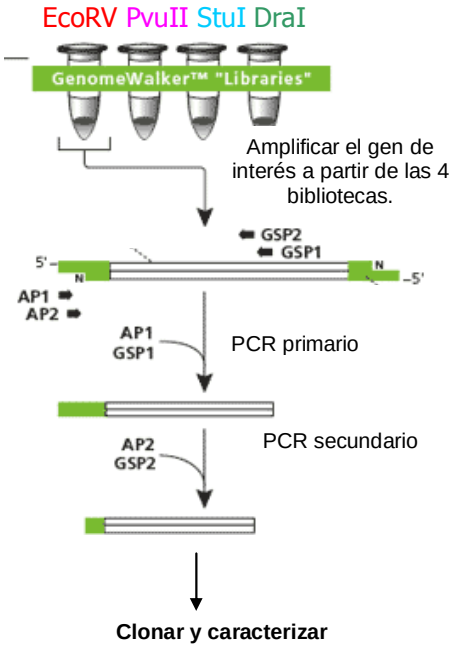


Figura 3. Esquema de la estrategia Genoma Walker utilizada para la obtención del promotor del gen *PvERF001*. El primer paso consiste en crear una biblioteca de DNA genómico, en donde se utilizaron las enzimas *Eco* RV, *Pvu* II, *Stu* I *y Dra* I, en seguida se utilizan estas cuatro bibliotecas para amplificar el gen de interés utilizando dos adaptadores (AP1 y AP2) provistos por el "Kit" y dos adaptadores específicos diseñados a partir de la región 5' (GSP1 y GSP2) codificante del gen de interés y, posteriormente, se llevan a cabo 2 ciclos de PCR. Modificado de Clontech, USA, 2007.

V. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO.

Para la identificación de factores transcripcionales del tipo AP2 en frijol se utilizó la base de ESTs (**E**xpressed **S**equence **T**ags) del género *Phaseolus* almacenada en NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov), usando como plantilla el dominio de unión a DNA del factor DREB1 de Arabidopsis (At4g25480). Para la búsqueda se utilizo el programa **tblastn**.

V.1. Alineamiento de secuencias

Para hacer los alineamientos correspondientes y establecer relaciones entre los diferentes ESTs que se encontrados, se utilizó el programa ClustalW (http://www.ch.embnet.org/software/ClustalW.html). El ClustalW es un

programa de computacional ampliamente utilizado para realizar alineamientos múltiples de secuencias. Este programa acepta un amplio rango de formatos de entrada. Incluyendo NBRF/PIR, FASTA, EMBL/Swissprot, Clustal, GCC/MSF, GCG9 RSF y GDE, el formato de salida puede ser alguno de los siguientes: Clustal, NBRF/PIR, GCG/MSF, PHYLIP, GDE, NEXUS. Este programa alinea por parejas cada secuencia y después todas las secuencias contra toda, las similitudes son guardadas en una matriz, la cual luego es en una matriz de distancias, donde la longitud de la distancia refleja la distancia evolutiva entre cada par de secuencias. De esta matriz de distancias, es creado un árbol de guía o filogenético utilizando un algoritmo de clustering neighbour-joining para determinar el orden en que los pares de secuencias serán alineados y combinados con alineamientos previos. Las secuencias son alineadas progresivamente en cada punto de ramificación empezando por los pares de secuencias más cercanos (Thompson y cols., 1994; Orengo, C. y cols. 2002).

Para obtener un arreglo visual de los alineamientos hechos con el programa ClustalW; se utilizó el programa BoxShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Este programa no desarrolla alineamientos por sí mismo y necesita que se le entregue un archivo creado por un programa de alineación múltiple. Para analizar las posibles relaciones filogenéticas entre cada secuencia de ESTs, se realizo un alineamiento múltiple de secuencias, utilizando la región conservada del dominio AP2, con el programa Clustal W. Posteriormente los datos fueron tomados en formato Clustal para que las secuencias pudieran ser reconocidas por el programa TREEVIEW versión 1.5 (http://www.bio.net/bionet/mm/bio-soft/1998-March/018384.html) (Page, 1996).

V.2. Identificación de posibles señales de localización subcelular

Para detectar posibles señales de localización subcelular contenidas en las secuencias del PvERF001 y PvERF002 se utilizó el programa PSORT II (http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/form2.html.). Este programa analiza la secuencia y predice posibles señales de localización subcelular basándose en los datos almacenados de proteínas conocidas. Por último, se informa el porcentaje de

probabilidad para los posibles sitios de localización subcelular de la proteína dada (Horton y Nakai, 1997).

V.III. Identificación de elementos *cis in silico*

Para obtener información de los posibles elementos que se encuentran en *cis* en la región promotora del gen *PvERF001* se utilizó la base de datos PLACE (**http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/index.html**.) PLACE es una base de datos de los motivos de elementos regulatorios del DNA que actúan en *cis* en plantas. Todos estos motivos están reportados y presentes en plantas vasculares. La base de datos contiene una breve descripción de cada motivo, literatura relevante y el número de acceso en el Pubmed.

Resultados.

I. Identificación de genes que codifican para FT tipo AP2 en frijol

Para identificar los genes que codifican para factores transcripcionales (FT) tipo AP2 de frijol, se llevó a cabo un análisis informático sobre la base de ESTs disponible en NCBI, sobre el género *Phaseolus*. Para llevar a cabo la búsqueda se utilizó la secuencia traducida del dominio de unión a DNA (57 aminoácidos) del FT DREB1a de *Arabidopsis* (Liu, y cols., 1998). De este análisis se obtuvieron 123 ESTs que codifican para estas proteínas. Se encontró que varios de los 123 ESTs detectados, estaban incompletos o presentaban posibles errores de secuenciación y además había redundancia de secuencias, por lo que se llevó a cabo una depuración de los datos obtenidos, para obtener finalmente 30 unigenes conteniendo el dominio AP2. Los unigenes se enlistan en la **Tabla 2**.

I.1 Análisis de los ESTs obtenidos

Sakuma y cols. (2002), han clasificado basados en el dominio de unión a DNA, han a los FTs tipo AP2 de *A. thaliana* en 2 grupos; el grupo DREB (o grupo A) y el grupo ERF (o grupo B); en esta clasificación, el grupo DREB contiene el aminoácido valina en la posición 14 (V14) del dominio de unión a DNA, mientras que el grupo ERF presenta en esta posición un residuo de alanina (A14). Se ha demostrado además que en el subgrupo DREB2 además de la valina en la posición 14 debe estar presente un glutámico en la posición 19 (E19), del dominio de unión a DNA (Sakuma y cols., 2002). Siguiendo estas reglas hemos identificado que de los 30 unigenes detectados en frijol, **15** contienen una valina en la posición 14 del dominio de unión, por lo que se clasificaron como FT del grupo DREB, mientras **12** secuencias contienen una alanina en la posición 14 del dominio de unión a DNA, por lo que se agrupan como ERFs (**Tabla 2**). De los 15 FT tipo DREB identificados se encontró que seis de ellos contienen un glutámico en la posición 19 (ESTs: 348, 744, 777,

537, 352 y 084), de éstos el 352 parece ser un gen ortólogo del subgrupo DREB2 (**Fig. 8A**). Hemos encontrado que los EST 333, 345 y 583 codifican para FTs que no pertenecen a los grupos DREB ni ERF (**Tabla 2 y Fig. 8a**). Poseen similitud con FTs previamente identificados en *A. thaliana*. El EST 345 tiene una homología del 87% a nivel de proteína con el FT tipo BABY BOOM de *Arabidospsis* un FT involucrado en la proliferación celular y la morfogénesis durante la embriogénesis en embriones y semillas (Boutilier y cols., 2002). La secuencia 583 codifica para una proteína con dos sitios de unión a DNA tipo AP2 lo cual es característico de los FT del tipo APETALA2, presenta un 62% de identidades positivas con la proteína APETALA2 de *Arabidopis*; los FT APETALA2 juegan un papel importante en la formación de la flor, particularmente en el desarrollo normal de sépalos y pétalos, aunque también se ha encontrado que este gen es necesario para el desarrollo de las semillas, y es un regulador negativo de genes homeóticos florales (Drews y cols., 1991; Byzova y cols., 1999). La secuencia 333 presenta un 86% de similitud con la proteína WRI1 (*WRINKLED 1*), la cual es un FT involucrado en la activación de genes que responden a azúcares y al control del flujo del carbón durante el importe de sacarosa para la acumulación de aceites en el desarrollo de la semilla, también es requerido para el desarrollo del embrión, la germinación de la semilla e indirectamente para el establecimiento de la plántula; es un regulador negativo de la inhibición de la germinación mediada por ABA (Cernac y cols., 2004; Masaki y cols., 2005; Cernac y cols., 2006).

Da andaNo. de acceso al NCBI	Nomenclatura Utilizada	Número de veces reportadas para el EST	Tejidos en donde se reporta								
			A	H	TVA	E	F	P	N	R	PR
CA896999	999	3				1	2				
CA902345	345	1				1					
CB540453	453	1						1			
CB542968	968	8	2				1	1			4
CV529583	583	2		1				1			
CV531597	597	4		2		1			1		
CV532250	250	3	2	1							
CV537333	333	1							1		
EX303607	607	5	2				2		1		
FD788570	570	26	18		4			2		2	
FE681817	817	14	10	3						1	
FE701917	917	10	10								
FE705018	18	10	6			2	1	1			
FG232909	909	7	2					1			4
FG233155	155	11			1		1				9
CA902348	348	2				2					
EX303744	PvERF001	4			1		1	1		1	
FD780777	777	1		1							
CV541537	PvERF002	2					1			1	
CV544084	84	2								2	
CA902352	352	2				2					
CV529572	572	3		1			1	1			
CV533267	267	1		1							
CV535404	404	1							1		
CV535730	730	2							2		
CV535836	836	3	2						1		
CV536700	700	1							1		
CV534276	276	16		2	6		6		2		
FE706185	185	3	2	1							
BQ481823	823	2		1	1						

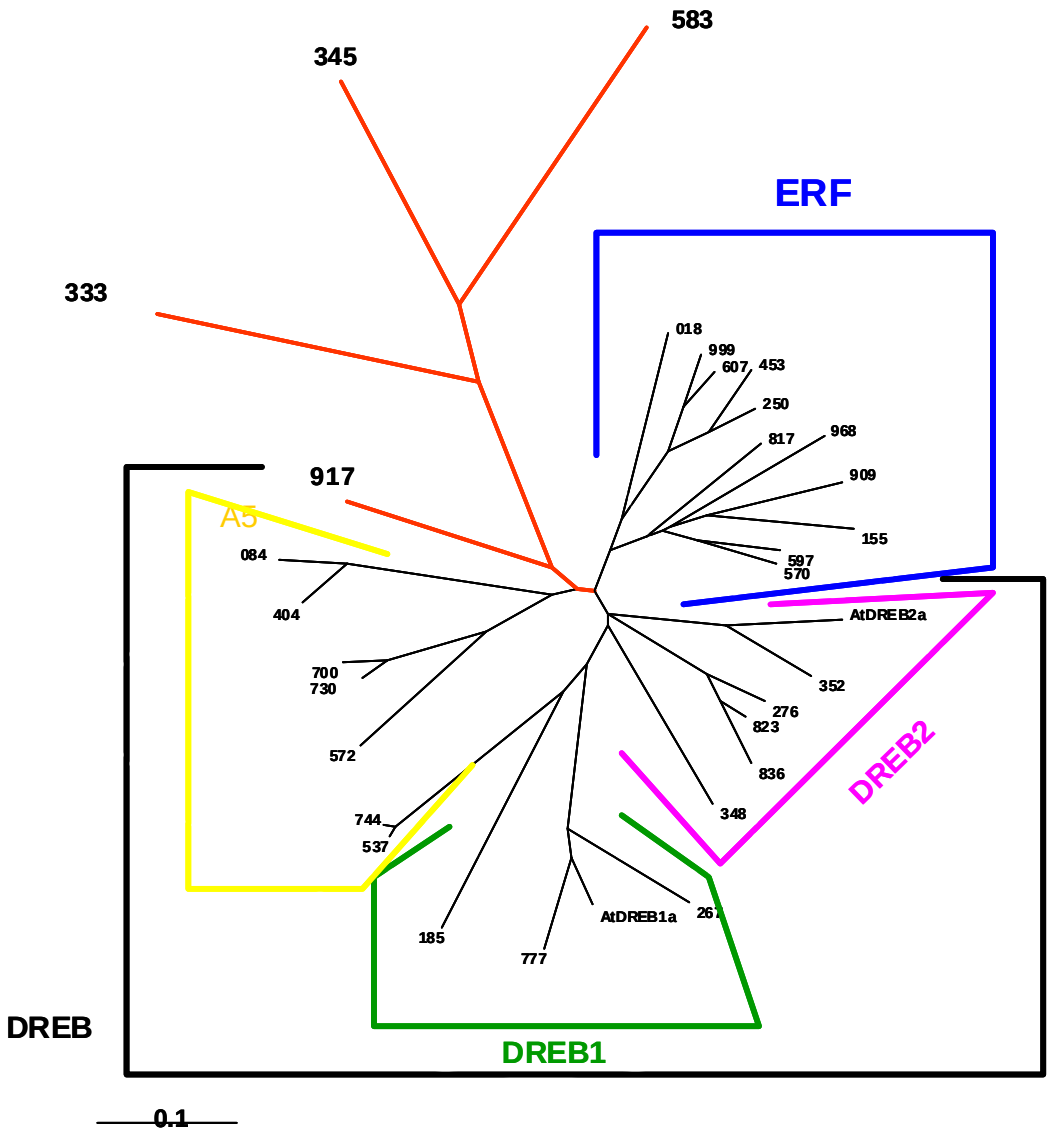
Tabla 2. Secuencias únicas que codifican para FT tipo AP2. Se muestran 30 unigenes de los 123 ESTs encontrados. Se presenta el número de acceso de cada EST al NCBI, la nomenclatura que se utiliza para cada ungen. Los números de la derecha presentan la abundancia de cada EST en diferentes tejidos en donde se observo su expresión. (A, agallas, H, Hoja, TVA, Tejido vegetativo aerial, E, embrión, F, fruto, P, plántulas, N, nódulo, R, raíz, PR, pelos radiculares.) , tomados en cuenta para el análisis de la expresión in silico de los 30 unigenes. En color azul se muestran los posibles genes ERF, en rojo los DREB, y en amarillo los DREB2.

I.2. Análisis de homologías para los genes de *Phaseolus vulgaris* que contienen el dominio AP2

Para determinar homologías entre los 30 genes identificados, se hizo la representación esquemática, utilizando el programa TreeView, de un archivo "boots-trapped", generado a partir de un alineamiento múltiple hecho con el programa CLUSTAL W. Este análisis se llevó a cabo usando sólo el dominio AP2 de los 30 ESTs seleccionados (**Fig. 8**), además se incluyeron, como referencia, las secuencias del dominio AP2 de las proteínas DREB1a y DREB2a de *Arabidopsis* (Liu y cols., 1998). Al analizar el árbol generado encontramos que la mayoría de los FTs se distribuyen en cuatro clusters, en uno de ellos se agrupan todos los FTs tipo ERF (**Fig. 8A**, cluster azul). Los otros tres corresponderían a los del subgrupo DREB (**Fig. 8A**, cluster negro), en estos se agruparían los que se encuentran más cercanos a los DREB1 (**Fig. 8A**, cluster verde), a DREB2 (**Fig. 8A**, cluster magenta) y al grupo A5 (**Fig. 8A**, cluster amarillo). También encontramos que tres FTs (333, 345, 583) no entran en ninguno de los subgrupos, como se había descrito previamente (Sakuma y cols., 2002).

Para analizar con mayor detenimiento la distribución del subgrupo DREB, se generó otro árbol, excluyendo el subgrupo ERF y los otros FTs (**Fig. 8B**). De este análisis de encontró nuevamente a los tres clusters o subgrupos: DREB1, DREB2 y A5; sin embargo encontramos que el EST 348 a pesar de tener características de un FT tipo DREB, no entra en ningún subgrupo (**Fig. 8B**). Este FT parece ser ortólogo a AtABI4, el cual está implicado en la regulación de la respuesta a ABA en semilla y actúa como un regulador negativo en la respuesta a glucosa en *Arabidopsis* (Finkelstein y cols., 1998; Acevedo y cols., 2005).

a)


583
345
ERF
333
018
999
607
453
250
817
968
909
155
597
570
917
A5
084
404
AtDREB2a
700
730
352
276
823
572
836
DREB2
744
537
348
AtDREB1a
267
185
777
DREB
DREB1
0.1

b)

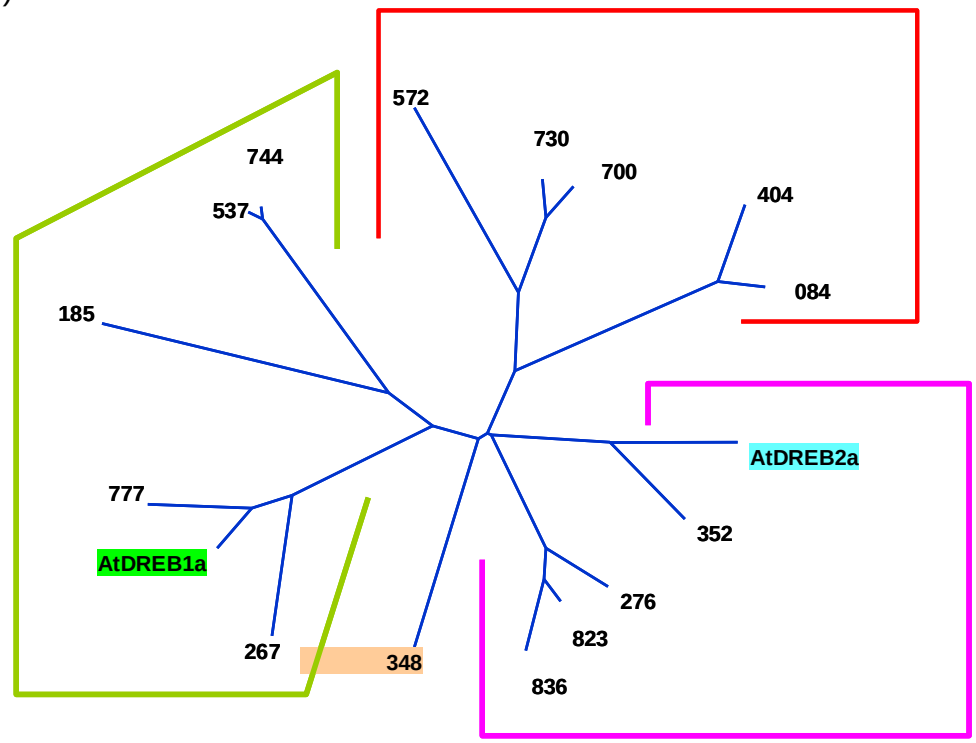


Figura 8. Árbol filogenético de los factores transcripcionales tipo AP2 de *Phaseolus.*

a) Árbol de homologías de los 30 ESTs de *Phaseolus*. El árbol se creó utilizando el programa CLUSTAL W, se observan 3 clusters principales; en uno se agrupan los FT tipo ERF (azul), en otro se agrupan los DREB (negro) y en un cluster se agrupan aquellos que no son DREB ni ERF (rojo), Cabe notar que el Grupo DREB, presenta subdivisiones, en donde encontramos aquellos parecidos a los DREB1 (verde), DREB2 (magenta) y a los A5 (amarillo).

b) Árbol filogenético de los DREB de *Phaseolus.* El árbol fue creado utilizando el programa CLUSTAL W, aquí se observan 3 clusters principales, los cuales comprenden a los DREB1 (verde), DREB2(magenta) y A5 (rojo), la secuencia que diverge, 348, es ortólogo a AtABI4.

II. Caracterización de los genes *PvERF001* y *PvERF002*

Uno de los objetivos de nuestro grupo es el de identificar y caracterizar los factores transcripcionales tipo AP2 involucrados en la respuesta a sequía en *Phaseolus vulgaris*, para esto seleccionamos dos FTs tipo DREB y con ellos llevamos una caracterización mas exhaustiva. Los FTs seleccionados son los que codifican los ESTs EX303**744** y CV541**537** (ver **Tabla 2**), a cuyos genes hemos denominado *PvERF001* y *PvERF002*.

II.1 Obtención del gen *PvERF001*

A partir de la secuencia reportada para el EST **744**, se diseñaron los oligonucleótidos A.F y A.R (**Fig. 9a**) para su amplificación por PCR, usando como templado DNA genómico de frijol, negro Jamapa. Se obtuvo un fragmento de 500 pb (**Fig. 9b**), el cual fue clonado en el vector TOPO 2.1 Al analizar la secuencia del plásmido recombinante se encontró que el fragmento clonado tenía una identidad del 100% con la secuencia reportada. Al analizar la secuencia traducida de la proteína encontramos que no estaba completa, ya que no contenía el codón de término de la traducción.

II.1.1 Obtención del gen completo *PvERF001* por 3'-RACE

Tomando como referencia el EST 744 (***PvERF001*),** se diseñó un oligonucleótido específico (Aa.F) (**Fig. 9a**), éste se utilizó junto con un oligonucleótido dT(20) y cDNA de frijol para obtener el extremo 3' faltante, utilizando el método de RACE 3'. Usando este método se obtuvo un fragmento de 1000 pb (**Fig. 9c**), el cual se clonó en el vector TOPO 2.1. Al analizar la secuencia obtenida se encontró que poseía 99 % de similitud con el gen *lac Z* de *E.coli*, por lo que los resultados obtenidos con este método fueron nulos.

II.1.2 Obtención del gen completo *PvERF001* mediante el ensamble de ESTs

Otra estrategia usada para la obtención de la región 3' faltante del gen *PvERF001*, consistió en realizar una búsqueda de ESTs adicionales para este gen sobre la base de datos de NCBI. Para esto se hizo una búsqueda usando el programa BLASTN utilizando la secuencia nucleotídica del 744, de este análisis se obtuvo otro EST de frijol (FD793817). Al ensamblar las secuencias de los ESTs 744 y FD793817 se logró obtener un cDNA que contenía un posible codón de inicio y de término de la traducción (**Fig. 9a)**. Para comprobar este dato se usaron los oligos A.F y Aa.com y mediante las reacciones de PCR a partir de

DNA genómico de frijol se obtuvo un fragmento de 600 pb (**Fig. 9d**). Al analizar la secuencia se comprobó la obtención del gen completo para *PvERF001*.

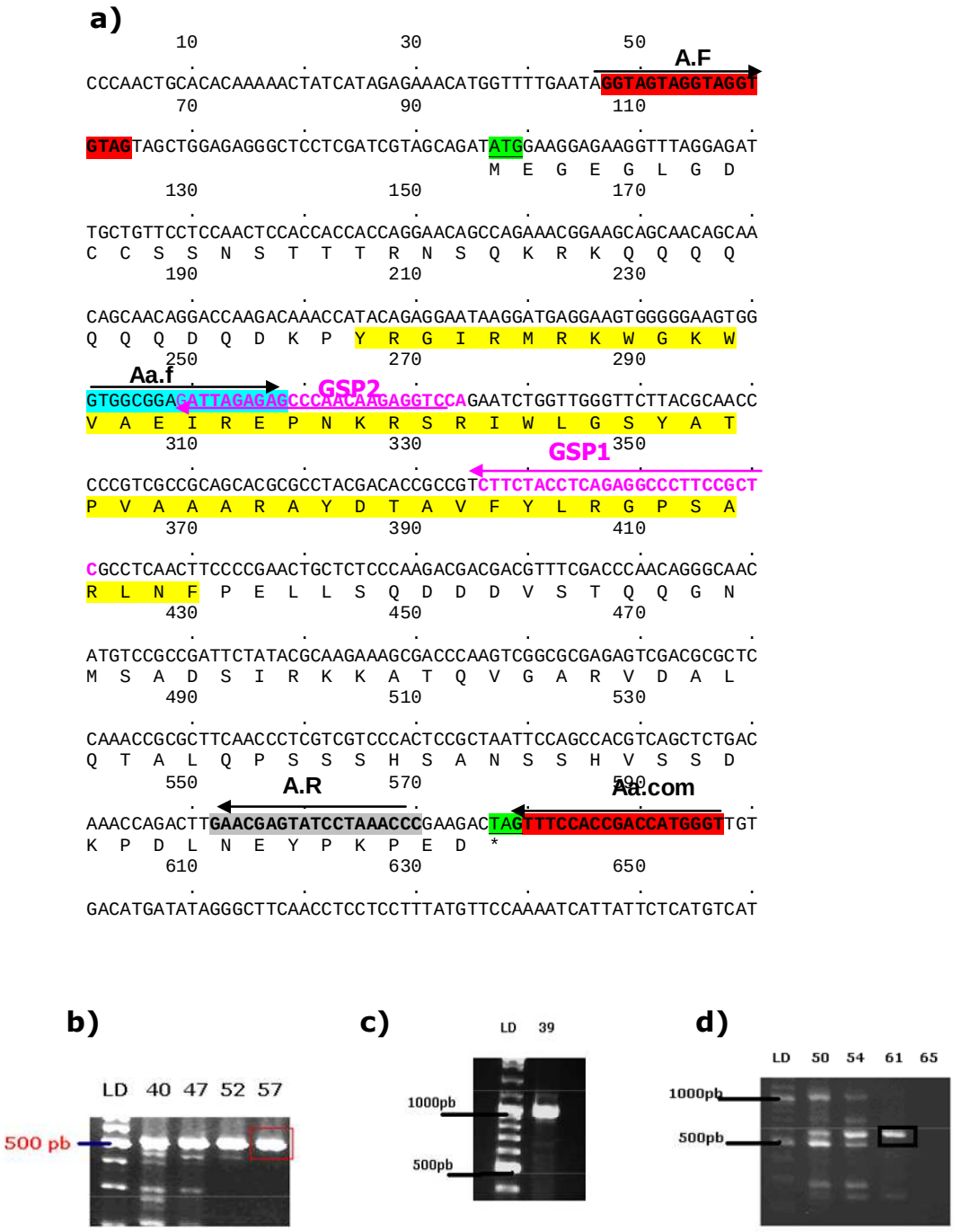


Figura 1. Obtención del gen completo *PvERF001*.

a) Secuencia obtenida del ensamble de los ESTs 744 y FD793817, se presenta a nivel de oligonucleótidos y aminoácidos. El codón de inicio y término de la proteína se indica en verde, en amarillo se resalta el dominio

de unión a DNA (AP2), las flechas indican la dirección de los diferentes oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen; para la amplificación del EST 744 se utilizaron los oligonucleótidos A.F y A.R (resaltados en rojo y gris), para el RACE 3´ se utilizó el oligonucleótido Aa.f (resaltado en azul), para la obtención del gen completo se utilizaron los oligonucleótidos A.F y Aa.com (resaltados en rojo), y para obtener la región promotora del gen PvERF001 se utilizaron los oligonucleótidos GSP1 y GSP2 (resaltados en rosa).

b) Fragmento de 500pb obtenido a partir de DNA genómico de frijol mediante reacciones de PCR, utilizando los oligonucleótidos A.F y A.F. Los números en la parte superior muestran las diferentes Tm utilizadas, LD es el marcador de peso molecular, y los números en el costado izquierdo indican los tamaños del marcador de peso molecular.

c) Fragmento de 1000pb obtenido a partir de la técnica RACE3'. Los números en la parte superior muestran las diferentes Tm utilizadas, LD es el marcador de peso molecular, y los números en el costado izquierdo indican los tamaños del marcador de peso molecular.

d) Fragmento de 600pb obtenido a partir de la utilización de los oligonucleótidos A.F y Aa.com, resultantes del ensamble de los ESTs, 744 y FD793817. Los números en la parte superior muestran las diferentes Tm utilizadas, LD es el marcador de peso molecular, y los números en el costado izquierdo indican los tamaños del marcador de peso molecular.

II.1. Obtención del gen *PvERF002*

A partir de la secuencia reportada para el EST **537** se diseñaron dos oligonucleótidos específicos (B.F y B.R) para amplificar el gen ***PvERF002*** (**Fig. 10a y Tabla 1**), usando DNA genómico de frijol. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 700 pb (**Fig.10b**), el cual fue clonado en el vector TOPO 2.1. Al analizar esta secuencia se obtuvo una identidad del 100% con el EST reportado. El gen *PvERF002* presenta un codón de inicio y uno de término, por lo que el EST reportado contiene el gen completo.

a)

```
   10                  30                  50
         .         .         .         .         .         .
GGGTTTTCTTGGTCTGAACGGAATCTGAGTTCTGAACTCATGTATTTTCACATGTTTCTG
        70                  90                 110
         .         .         .         .         .         .
CATCATCTTTCTTTCTATATATATTATTCACACACTTGTAAATGATTGCGAAGAAGATAA
       130                 150                 170
         .         .         .         .         .         .
GATAGGCACAAGCTAGCATATTATAGTTTATTTTATTTGATTTAATCAGCTACCTAATAG
       190                 210                 230
         .         .         .         .         .         .
CTAGCCTTACAGTTATAAATATATAGATACAGATATAGCTGGGTAGGTATATGGTAGTTA
                                                   M  V  V  N
       250                 270                 290
         .         .         .         .         .         .
ATTTACTCATGGAATATAGGGATCACTGTTGCTCCAACGATTCAACCATCACCAACAGAA
  L  L  M  E  Y  R  D  H  C  C  S  N  D  S  T  I  T  N  R  T
       310                 330                 350
         .         .         .         .         .         .
CAAGAACCAGAAGCAGAAGCCCCAGAACAACCTTGGACAAATCCAAGAACCAACACCACG
  R  T  R  S  R  S  P  R  T  T  L  D  K  S  K  N  Q  H  H  D
       370                 390                 410
         .         .         .         .         .         .
ACAAACCCATGAAGCCGTACCGAGGAATACGGATGAGGAAGTGGGGAAAGTGGGTGGCGG
  K  P  M  K  P  Y  R  G  I  R  M  R  K  W  G  K  W  V  A  E
       430                 450                 470
         .         .         .         .         .         .
AGATCAGAGAACCGAACAAGAGGTCCAGGATTTGGCTGGGCTCGTACACCACGCCTGTCG
  I  R  E  P  N  K  R  S  R  I  W  L  G  S  Y  T  T  P  V  A
       490                 510                 530
         .         .         .         .         .         .
CCGCCGCACGCGCCTACGACACCGCCGTTTTCTACCTCCGAGGTCCCTCCGCGCGCCTCA
  A  A  R  A  Y  D  T  A  V  F  Y  L  R  G  P  S  A  R  L  N
       550                 570                 590
         .         .         .         .         .         .
ATTTCCCCGAACTTTTGTTTCAGGACGAGGCCGACGGCGCTAACGACGACGATTCCGTGA
  F  P  E  L  L  F  Q  D  E  A  D  G  A  N  D  D  D  S  V  N
       610                 630                 650
         .         .         .         .         .         .
ACATGTCAGCTGATTCCATCCGCCGCAAAGCCACGCAAGTCGGCGCCAGAGTCGACGCGC
  M  S  A  D  S  I  R  R  K  A  T  Q  V  G  A  R  V  D  A  L
       670                 690                 710
         .         .         .         .         .         .
TCCAAACCGCGCTTCGCCATCACGCGCCTTCGCACAACCCGACCCAAATCTCTCTCAAAC
  Q  T  A  L  R  H  H  A  P  S  H  N  P  T  Q  I  S  L  K  P
       730                 750                 770
         .         .         .         .         .         .
CCGACTTTGACGAGTTCCCGAAACTCGAAGACCTTCAAGATTGATATGAATCCATGTCGA
  D  F  D  E  F  P  K  L  E  D  L  Q  D  *
       790
         .         .
TCAACAATATTNCATTTCCTAAGNTATTT
```

b)

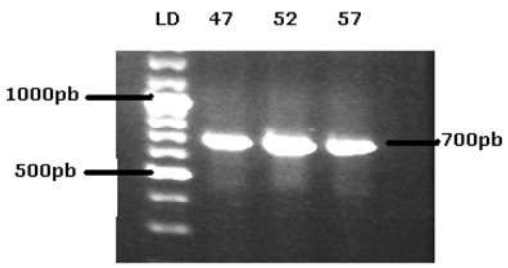


Figura 2. Obtención del gen PvERF002.

a) La secuencia nucleotidica del ESTs 537 (PvERF002) se presenta a nivel de oligonucleótidos y aminoácidos,. El codón de inicio y el de terminación se resaltan en verde y amarillo; se indica el dominio de unión a DNA el AP2, las flechas indican la dirección de los oligonucleótidos específicos (B.F y B.R) usados para obtener el gen completo.

b) Fragmento de 700pb esperado y obtenido mediante reacciones de PCR a partir de DNA genómico de frijol, los números en la parte superior indican las diferentes Tm seleccionadas, LD, es el marcador de peso molecular , los números en el costado izquierdo indican el tamaño del marcador de peso molecular y los de la derecha indican el tamaño del fragmento obtenido.

II.2 Análisis estructural de las proteínas deducidas de los genes *PvRF001* y *PvERF002*

Al analizar las secuencias nucleotidicas de los genes *PVERF001* y *PvERF002* se encontró que éstos no poseen intrones y que las proteínas codificadas por ellos tienen 160 y 177 aminoácidos, respectivamente. Estas proteínas pueden ser clasificadas como FT de la subfamilia DREB, ya sea dentro del grupo A1 (en donde se encuentran los FT tipo DREB2) o A5 (en donde se encuentran los genes RAP2.1, RAP2.9 y RAP2.10), basados en la presencia de un residuo de valina en la posición 14 y glutámico en la posición 19 de su sitio de unión a DNA (Sakuma y cols., 2002).

Las proteínas PvERF001 y PvERF002 presentan regiones ricas en aminoácidos básicos en su extremo amino y dentro del sitio de unión a DNA (**Fig. 11**), estas regiones podrían funcionar como señales de localización nuclear (**NLS**) (Hicks y cols., 1995). Al llevar a cabo un análisis bioinformático de las proteínas PvERF001 y PvERF002 utilizando el programa de predicción subcelular PSORT II, se encontró que ambas proteínas contienen una posible NLS, a partir del residuo 20 del dominio de unión a DNA, compuesta por lisinas y argininas (PNKRSRI) (**Fig. 11**). Se encontró además que la proteína PvERF001 posee una fila de siete residuos de glutamina en su amino terminal y una secuencia de aminoácidos similar a un motivo **EAR** (PDLNEYP; Ohta y cols., 2001) (**Fig. 11**). El motivo EAR se ha encontrado en FTs que funcionan como represores de la transcripción, incluidos del tipo ERF (Ohta y cols., 2001).

PvERF001

MEGEGLGDCCSSNSTTTRNSQKRKQQQQQQQDQDKPYRGIRMRKWGKWVAEIREPNKRS
RIWLGSYATPVAAARAYDTAVFYLRGPSARLNFPELLSQDDDVSTQQGNMSADSIRKKA
TQVGARVDALQTALQPSSSHSANSSHVSSDKPDLNEYPKPED

PvERF002

MVVNLLMEYRDHCCSNDSTITNRTRTRSRSPRTTLDKSKNQHHDKPMKPYRGIRMRKWG
KWVAEIREPNKRSRIWLGSYTTPVAAARAYDTAVFYLRGPSARLNFPELLFQDEADGAN
DDDSVNMSADSIRRKATQVGARVDALQTALRHHAPSHNPTQISLKPDFDEFPKLEDLQD

Figura 3. Identificación de posibles señales de localización subcelular en las proteínas *PvERF001* y *PvERF002*. Se indican en rojo los sitios de localización nuclear (NLS). En amarillo se indica el sitio de unión a DNA (AP2), el motivo VAEIRE característico de las proteínas tipo DREB2, se resalta en azul. El motivo de represión EAR en PvERF001 se muestra en verde.
.

Al analizar la representación esquemática del alineamiento múltiple de los unigenes AP2 de frijol **(Fig. 12a),** encontramos que las proteínas PvERF001 y PvERF002 son muy parecidas entre ellas. Al realizar un alineamiento, se encontró que ambas tienen 61.1% de identidad y 67.6% de similitud, el dominio de unión a DNA de ambas proteínas solo difiere en una sustitución de un aminoácido en la posición 32 dentro del AP2. (**Fig. 12a**). Además se encontró que poseen alta homología con los FT del subgrupo A-5 de la subfamilia DREB de *Arabidopsis* **(**Sakuma y cols., 2002**)** y con el FT GmDREB1 de soya **(**Li y cols., 2005**)**. Al hacer un alineamiento múltiple entre PvERF001, PvERF002, GmDREB1 y RAP2.1, se observa que estas proteínas poseen un motivo conservado en el extremo C-terminal, este motivo es VGARVDAL. En este análisis se detectó que la proteína PVERF002 posee una serie de adiciones de aminoácidos en el extremo amino terminal (**Fig. 12b**).

a)

```
# Identity:     113/185 (61.1%)
# Similarity:   125/185 (67.6%)
# Gaps:          33/185 (17.8%)

#=====================================

EMBOSS_001         1       MEGEGLGDCCSSNSTTTRNSQKR---------KQQQQQQQDQDK     35
                           ||..  ..|||::||.|..::.|         |.:.|......|
EMBOSS_001         1 MVVNLLMEYR--DHCCSNDSTITNRTRTRSRSPRTTLDKSKNQHHDKPMK     48

EMBOSS_001        36 PYRGIRMRKWGKWVAEIREPNKRSRIWLGSYATPVAAARAYDTAVFYLRG     85
                     ||||||||||||||||||||||||||||||.||||||||||||||||||
EMBOSS_001        49 PYRGIRMRKWGKWVAEIREPNKRSRIWLGSYTTPVAAARAYDTAVFYLRG     98

EMBOSS_001        86 PSARLNFPELLSQD------DDVSTQQGNMSADSIRKKATQVGARVDALQ    129
                     |||||||||||.||      ||.|.   ||||||||:||||||||||||||
EMBOSS_001        99 PSARLNFPELLFQDEADGANDDDSV---NMSADSIRRKATQVGARVDALQ    145

EMBOSS_001       130 TALQ-PSSSHSANSSHVSSDKPDLNEYPKPED       160
                     |||: .:.||  |.:.:|. |||.:|:||.||
EMBOSS_001       146 TALRHHAPSH--NPTQISL-KPDFDEFPKLEDLQD    177
```

b)

```
PvERF001    1 MEG----EGLGDCCSSNSTTTRNSQKRKQ---------QQQQQQDQDKPYRGIRMRKWGK
PvERF002    1 MVVNLLMEYRDHCCSNDSTITNRTRTRSRSPRTTLDKSKNQHHDKPMKPYRGIRMRKWGK
GmDREB2     1 MEE----AGLGDCCSSNTTITRKSEKRK------------QQHQQQEKPYRGIRMRKWGK
RAP2.1      1 MER----EQE------ESTMRKRRQPP---------QEEVPNHVATRKPYRGIRRRKWGK

PvERF001   48 WVAEIREPNKRSRIWLGSYATPVAAARAYDTAVFYLRGPSARLNFPELLSQDD-D-VST-
PvERF002   61 WVAEIREPNKRSRIWLGSYTTPVAAARAYDTAVFYLRGPSARLNFPELLFQDEADGANDD
GmDREB     45 WVAEIREPNKRSRIWLGSYATPVAAARAYDTAVFHLRGPSARLNFPELLSQDD-D-VSTQ
RAP2.1     42 WVAEIREPNKRSRLWLGSYTTDIAAARAYDVAVFYLRGPSARLNFPDLLLQEE-DHLSAA

PvERF001  105 QQGNMSADSIRKKATQVGARVDALQTALQPS-SSHSANSSHVSSDKPDLNEYPKPE---D
PvERF002  121 DSVNMSADSIRRKATQVGARVDALQTALRHHAPSH--NPTQIS-LKPDFDEFPKLEDLQD
GmDREB2   103 QQGKMSADSIRQKATQVGARVDALQTALQQSSSTHSISSSHVSYEKPDLNEYPKPE---D
RAP2.1    101 TTADMPAALIREKAAEVGARVDALLASAAPS-MAHS----TPPVIKPDLNQIPESGD--I
```

Figura 4. Análisis estructural de las proteínas *PvRF001* y *PvERF002*

a) Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de las proteínas PvERF001 y PvERF002. En amarillo se muestra el sitio de unión a ADN de ambas proteínas, en azul se resalta la diferencia de aminoácidos en el AP2. Los números a la izquierda y derecha indican el número de aminoácidos; en la parte superior se muestran los porcentajes de identidad, similitud y "gaps" entre estas proteínas.

b) Alineamiento múltiple de las proteínas: PvERF001, PvERF002, GmDREB y RAP2.1. En verde se resalta un motivo conservado en el extremo C-terminal, en azul la adición de aminoácidos que presenta la proteína PvERF002, en el extremo amino terminal. A la izquierda se muestra el nombre de cada proteína y los números representan el número de aminoácidos presentes en cada secuencia de proteínas.

II.3 Análisis parcial de la Expresión de los genes *PvERF001* y *PvERF002 in silico*.

Para tener una idea de la abundancia de cada uno de los 30 unigenes, se procedió a determinar el número de ESTs para cada unigen, así como la condición en la que se detecta. Aunque este análisis nos puede dar indicio de la expresión de estos genes, tiene varias limitaciones, por ejemplo, la eficiencia para la obtención de los ESTs, otra es que la producción de los ESTs a veces no se llevó a cabo en el órgano o estadio de interés.

Este análisis identificó una serie de ESTs provenientes de diferentes proyectos genómicos entre los cuales destacan la base de ESTs obtenidos de las agallas inducidas por *Uromyces appendiculatus* trabajo realizado por el Centro Nacional de Biotecnología del Frijol, de la Universidad de Missouri y Columbia en EUA, (Thibivilliers y cols., 2008), el banco de ESTs obtenidos de hojas de *P. vulgaris* trabajo realizado por el Centro Nacional para la Agricultura Tropical, CIAT (Blair y cols., 2002), el banco de ESTs provenientes de tejido vegetativo aerial bajo condiciones de frío, de la Universidad de Saskatchewan en Canadá (Vijayan y cols., 2008), el banco de ESTs obtenidos de embriones de *P.vulgaris,* trabajo hecho por de la Universidad de Los Ángeles, Ca. (Goldberg y cols., 2002), el banco de ESTs obtenido del tejido del fruto, del Proyecto del Instituto de Biotecnología en Malaka, Malasia (Bhore y cols., 2008), el banco de ESTs provenientes de Plántulas del de la Universidad de Sao Paulo, Brasil (Melotto y cols., 2005), el banco de ESTs provenientes de hoja, nódulos y raíz, del Centro de Fijación de Nitrógeno de la Universidad Nacional Autónoma de México (Lara y cols., 2005) y el de ESTs provenientes de pelos radiculares de *P. vulgaris* trabajo realizado por la Universidad Nacional de la Plata, Argentina (Aguilar y cols., 2008).

Analizando los datos disponibles encontramos varios ESTs que codifican para FTs tipo AP2 y se acumulan en diferentes tejidos y en varios estados del desarrollo de la planta **(Tabla 2)**. Su expresión se observa en embriones, plántulas, hoja, raíz, fruto y en tejido aéreo; algunos parecen ser muy específicos

como los ESTs 555 y 267, encontrados solamente en las bases de datos provenientes de bibliotecas de hojas. Los ESTs 700, 333 y 404 se detectaron únicamente en nódulos de frijol. Para los genes seleccionados *PvRF001* y *PvRF002* encontramos ESTs en tejidos muy específicos; el gen *PvRF002* únicamente se detectó en raíz y fruto; mientras que el *PvRF001* se observó en plántulas, tejido vegetativo aerial, en raíz y fruto. Un dato esperado es que los ESTs asociados al posible gen ABI4 de frijol se detectaron únicamente en embrión, lo cual es consistente con los datos obtenidos para el gene ABI4 de *A. thaliana* cuya expresión se ha observado únicamente en semillas (Soederman y cols., 2000.) (**Tabla 2**).

II.4 Caracterización de los patrones de acumulación de los mRNAs de los genes *PvERF001* y *PvERF002* en respuesta a déficit hídrico.

Se determinaron los patrones de acumulación de los RNAs mensajeros para los genes *PvRF001 y PvRF002* mediante experimentos tipo "Northern". Los resultados obtenidos muestran que sus transcritos se acumulan en plántulas de 4 días tanto en la condición control y como en el tratamiento por déficit hídrico, con una acumulación máxima a las 3 horas en plántulas bajo tratamiento (**Fig.13**). En plantas maduras (25d) se determinó que la acumulación de los transcritos para ambos genes es modulada por déficit hídrico. Los transcritos de *PvRF001* se acumulan en hojas de plantas sometidas a déficit hídrico; mientras los transcritos de *PvRF002* se acumulan en raíces de plantas bajo déficit hídrico (**Fig.13**). Para confirmar que las plantas utilizadas realmente sufrieran estrés hídrico, se utilizó como sonda especifica de sequía el cDNA del gen PvLEA4, cuyo trascrito se ha reportado que se acumua bajo condiciones de déficit hídrico tanto en plántulas como en plantas adultas (**Fig.13**) (Colmenero-Flores y cols., 1997).

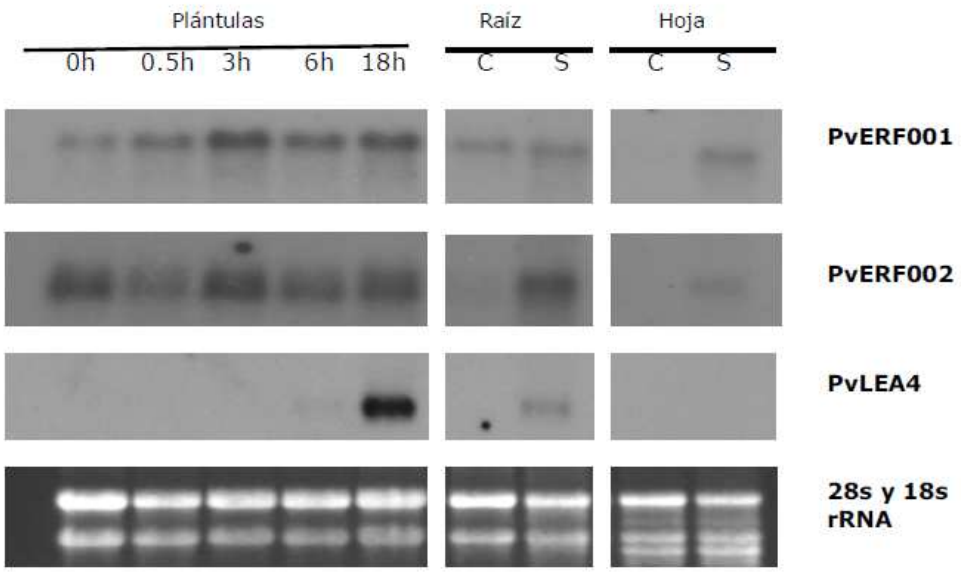


Figura 5. Patrones de acumulación de los transcritos de los genes *PvERF001* y el *PvERF002* en respuesta a sequía. El RNA total fue extraído de plántulas de 4 días de *P. vulgaris* variedad Negro Jamapa a 0, 0.5, 3, 6 y 18 h después del tratamiento bajo déficit hídrico y de hojas y raíces de plantas de 21 días de crecimiento igualmente sometidas a estrés hídrico. El transcrito de PvLEA4 se usó como control de sequía. Como controles de carga se muestran los transcritos de los RNAs ribosomales 28s y 18s respectivamente.

III. Obtención de la región promotora del gen *PvERF001*

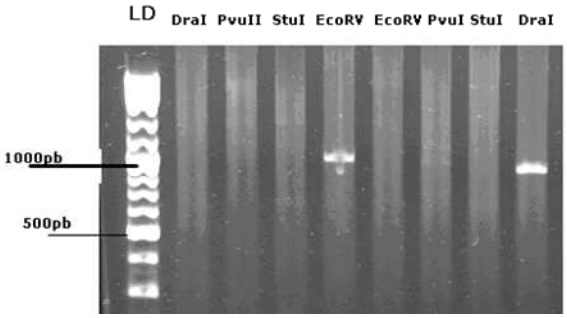
Para confirmar que el codón de inicio de la traducción fuera el propuesto anteriormente para el gen *PvERF001,* se decidió obtener parte de la región 5' no traducida para el gen *PvER00F1,* la cual incluiría parte de la región promotora, mediante el uso del sistema de **G**enome **W**alker (ver **Material y Métodos**). Para esto se utilizó como plantilla la región codificante del gen *PvERF001,* la cual se utilizo para diseñar dos oligonucleótidos específicos GSP1 y GSP2, (**Fig. 9a**) los cuales se utilizaron junto con los oligonucleótidos de los adaptadores incluidos en el kit de GW (AP1 y AP2). Mediante PCR y usando como templado los diferentes bancos genómicos generados se obtuvieron 2 fragmentos, uno de aproximadamente 900 pb obtenido de la biblioteca de la enzima de restricción *Dra*I, y otro de 1100 pb de la biblioteca de *Eco*RV (**Fig.14a**). Al secuenciar los fragmentos obtuvimos una secuencia de 908 pb por arriba del sitio de inicio de la traducción del gen de interés; el análisis de esta región nos permitió confirmar que el condón de inicio deducido a partir del EST es el correcto y además nos

posibilito para hacer un análisis de las secuencias regulatorias en *cis* del promotor del gene *PvERF001*.

III.1 Análisis computacional de las secuencias regulatorias de la región promotora del gen *PvERF001*

Para poder analizar la región del promotor del gen *PvERF001* y detectar las posibles secuencias regulatorias presentes en *cis*, se utilizó el programa PLACE (ver Materiales y Métodos). Se encontraron los siguientes elementos en *cis*: cuatro tipo MYB, un MYC, dos ABRE y dos DRE (**Fig. 14b**), la presencia de dichos elementos se restringe a los promotores de genes que responden a estrés por sequía (Yamaguchi- Shinozaki, y Shinozaki**,** 2005), MYC y MYB se encuentran en la región promotora del gen *RD22* el cual se induce por déficit hídrico, salinidad y ABA; mientras que los elementos tipo ABRE y DRE se encuentran en la región promotora del gen *RD29B* y *RD29A* respectivamente, estos genes se inducen por ABA, frío, estrés salino y déficit hídrico. El encontrar elementos tipo DRE y ABRE en el promotor del gen *PvERF001* sugiere que este gen podría responder tanto a la vía dependiente e independiente de ABA y podría estar regulando genes que responden a estrés de tipo abiótico. También se encontraron elementos tipo GT1 (no mostrados) , los cuales están involucrados en la inducción de genes que responden a luz (Hiratsuka y Chua, 2006), y el elemento WRKY, el cual es un elemento regulador negativo de ABA, un represor de giberelinas y también responde a estrés biótico (Dong y cols., 2003; Eulgem y cols., 2000).

a)



b)

```
-585  ATATGTAAGT TATTTAGATG AAAAATATAA TAAATTAAAT TTATTTACAT

-535  CCTTGATAAA ATATTAAGAA ATGAAGATAT AATGTTTTTG TAAATCGTTA

-485  ATGAAGATAT GGAGTATTGA AGAAGAAAAA GTGTGTTGAA ATGAAGTAAA
                 MYB        MYB
-435  ATCTGAGAAG GGATAAGTGA TGGGATAGAG TGAGAGACAG TAGTATGTAT
                         ABRE                WRKY
-385  AGAGAGGCGT AACCCGTCCA CGTCGGCGAT GGATGACATT GGGCAGAGGA
                            DRE
                                        MYB
-335  GGCTGCGTGG AATGTATGAA ATAGGAACAA AAAACGGAGT TTTGAAATGA

-285  AGAAGGAGAG AGAGAGAGAG AGATAGGGTG ATGGATTGTG TCGGCCATCT
                                                  DRE
                                ABRE
-235  TTGGATTTAT CTTAAAGAAA GCTCAACGTG GCGGCCGTAA CAGACGACAG
                 MYC
-185  ACTAGAAGCC AAGTGGGAAA CTCATTCCCT TCCCTTCTCC CTCTTCTCTC

-135  CCATTCATCC ATTCAATAAT ATAATATAAT ACTATTATTC CTTTCCACAC
                                MYB
-  85 AAACTATTTC CCATTTTCCT TTTCCAACCT CAGTATAAAT ACAAGCCAAT

-  35 ACAACAGCAA CATCGTTTCA GTTTCTTCAG GGACCTATCA GCACAATTTC

+  16 CTTGCACTTC CCAACTGCAC ACAAAAACTA TCATAGAGAA ACATGGTTTT

+  66 GAATAGGTAG TAGGTAGGTG TAGTAGCTGG AGAGGGCTCC TCGATCGTAG
```

Figura 6. Región promotora del gen *PvERF001*

a) Se muestran los fragmentos de PCR generados a partir de la utilización de la técnica Genoma Walker utilizando los bancos de enzimas *Pvu II*, *StuI*, *DraI* y *EcoRV*; usando el banco de *Eco*RV se obtuvo un fragmento de 1100 pb y con el de *Dra*I se obtuvo un fragmento de 900pb. LD es el marcador de peso molecular, los números de la izquierda indican los tamaños del marcador de peso molecular.

b) Secuencia nucleotídica de la región promotora del gen PvERF001, se muestran los elementos regulatorios en *cis* que fueron encontrados mediante un análisis teórico, los elementos obtenidos se resaltan en colores, en amarillo los MYB, en azul los ABRE, en rojo MYC, en café los DRE, en verde la posible caja TATA y el inicio de la traducción respectivamente (ATG), las flechas indican el sentido de dichos elementos.

Discusión.

Las plantas han desarrollando varias adaptaciones para protegerse del estrés ambiental. La modulación transcripcional es uno de los pasos importantes para establecer una respuesta (Raven y cols., 1992). Los mecanismos de acción de la respuesta génica en plantas durante el estrés hídrico están finamente regulados, en esta regulación participan varios factores transcripcionales (Shinozaki y cols., 2003). Algunos de los factores transcripcionales, involucrados en la respuesta al déficit hídrico en *A. thaliana*, pertenecen a la familia de FT tipo AP2 y pertenecen al subgrupo de FT tipo DREB (DREB1 y DREB2). Se ha encontrado que los FTs tipo DREB participan en una vía de respuesta independiente de la fitohormona ABA, reconocen al elemento en *cis* DRE, los cuales se encuentran en la región promotora de los genes blanco (Yamaguchi- Shinozaki y Shinozaki, 2006). La caracterización de los FTs tipo DREB se ha enfocado esencialmente al estudio de las proteínas tipo DREB1 y DREB2 en la planta modelo *A. thaliana* (Yamaguchi- Shinozaki y Shinozaki, 2006). Sin embargo, en plantas de interés agronómico como arroz, frijol, maíz, soya, tomate, trigo los estudios son escasos o nulos. Debido a lo anterior uno de nuestros objetivos fue el de identificar y clasificar los FT con el dominio AP2 en frijol. Dentro de este objetivo además se suma el interés de caracterizar molecularmente el papel de algunos de ellos durante la respuesta al estrés hídrico.

Identificación y clasificación de FT tipo AP2 de frijol

De una búsqueda en el banco de secuencias de ESTs disponible en NCBI para el género *Phaseolus,* logramos identificar 30 secuencias únicas conteniendo el dominio AP2 (**Tabla 2).** Siguiendo los criterios de clasificación de Sakuma y cols., (2002) agrupamos los 30 unigenes en 12 genes tipo ERF y 15

tipo DREB además de identificar 3 FT que no entraban en estos dos subgrupos (**Tabla 2 y Fig.8a**). Dentro de los FTs tipo DREB identificados en frijol se seleccionaron dos para llevar un análisis más exhaustivo, los cuales les hemos denominado como *PvERF001* y *PvERF002 (***Fig. 11***)*.

En este trabajo se obtuvieron los genes completos de *PvERF001* y *PvERF002* a partir de DNA genómico de *P. vulgaris* de la variedad negro Jamapa (**Fig. 9 y 10**), una característica común de ambos genes es que no contienen intrones (**Fig. 12a**). Al comparar la secuencia de estas proteínas con otros miembros del grupo A5 de A. thaliana (RAP2.1, RAP2.9 y RAP2.10) y con el GmDREB2 se observa que entre estas proteínas el dominio AP2 esta altamente conservado (**Fig. 12b**). Mientras que en el resto de las proteína, tanto en el extremo C-terminal como en el N-terminal, hay una baja similitud; esto tal vez sea debido a que el dominio AP2, el cual da la especificidad de unión al elemento *cis*, no puede sufrir de muchas variaciones, ya que si estas sucedieran, el FT perdería dicha especificidad. En cambio el resto de la proteína no requiere de una alta conservación para llevar a cabo su función.

Al llevar a cabo un análisis de las posibles secuencias de localización sub-cellular en los FT seleccionados se determinó que ambas poseen dos posibles señales de localización nuclear (NLS), una de ellas situada en el extremo amino terminal y la otra dentro del dominio de unión a DNA (**Fig. 11**), la presencia de al menos de una de estas señales garantiza una translocación eficiente al núcleo; en un proceso que parece depender en parte de la asociación de la proteína con importinas de tipo α o β (Hicks y Raikhel, 1995.). No obstante, no solo estos dos NLS serían suficientes por sí solos para explicar la totalidad de la translocación al núcleo de la célula vegetal, este transporte también parece verse promovido (o modulado) por otros mecanismos alternativos, como la interacción con otras proteínas transportadoras y la existencia en su secuencia de sitios de fosforilación y ubiquitinación (Goerlich, 1998.), ambas proteínas PvERF001 y PvERF002 además de presentar dos NLS en el extremo amino terminal tienen varios residuos de serinas y treoninas en el

extremo N-terminal, los cuales también podrían estar involucrados en la translocación al núcleo.

Se ha establecido que los FT tipo DREB1 y DREB2 son capaces de unirse al elemento DRE y a la caja GCC y de esta manera transactivar a genes que se encuentran río abajo; la especificidad de unión esta determinada por la secuencia de aminoácidos VAEIRE a partir de la valina 14 dentro del AP2 (Yamaguchi- Shinozaki y Shinozaki, 2006. Sakuma y cols., 2002.), las proteínas PvERF001 y PvERF002 poseen el motivo VAEIRE dentro de la secuencia del AP2, por lo que podrían ser proteínas homólogas al subgrupo DREB2 de *A. thaliana* (Chen y cols. 2007. Liu y cols. 1998.), por lo que podría proponerse que FT PvERF001 y PvERF002 al igual que las proteínas del subgrupo DREB2 de Arabidopsis podrian unirse al elemento DRE, sin embargo, es necesario corroborar esto mediante un análisis de movilidad en gel, y así observar la especificidad de unión de las proteínas PvERF001 y PvERF002 con el elemento DRE u otro elemento de unión.

***PvERF001 y PvERF002* se acumulan abundantemente en plántulas de 4 días y su acumulación se modula por estrés hídrico en planta adulta**

Aunque inicialmente teníamos la idea de que los transcritos de los FTs se acumulan muy poco y en el caso de los FTs tipo DREB su acumulación seria modulada por el estrés o alguna otra señal, algo que nos sorprendió fue encontrar que los transcritos de los genes *PvERF001* y *PvERF002* se acumulan abundantemente en plántulas del frijol de 4 días y no son modulados por sequía (**Fig. 13**). Una posibilidad para explicar nuestros hallazgos, es que la planta, en estadios tempranos de crecimiento, mantiene en un estado de alerta constante para responder rápidamente ante cualquier cambio de los factores externos e internos, y en cambio en estados de crecimiento posteriores, la planta desarrolla estructuras con las cuales podría ya contender con las fluctuaciones ambientales, sin necesidad de mantener el “estado de alerta” durante las condiciones control. En cambio en las condiciones de estrés, la planta adulta

modularía la expresión de los FTs PvERF001 y PvERF002, lo que podría explicar el patrón de acumulación encontrado en esta fase (**Fig.13**) Otra observación interesante es el que transcrito de *PvERF002* se acumula mas que el de PvERF001, lo cual nos puede sugerir que ambos llevan a cabo diferentes funciones, una de ellas podría ser la de represor para *PvERF001* y la de activador transcripcional para *PvERF002* y en conjunto los dos factores estarían regulando la transcripción de los genes blanco. Otra posibilidad es que estos FTs se unen a diferentes elementos *cis* dando como resultado que cada uno de ellos regularía 2 sets diferentes de genes blanco.

Interesantemente hay una acumulación mayor del transcrito del PvERF002 en raíz con respecto a hojas comparando la misma severidad del estrés; para este caso en particular, esto se explica porque durante el proceso de deshidratación, el órgano que percibe el estrés con mayor sensibilidad y en un primer plano es la raíz No obstante aunque se observe una acumulación significativa de los transcritos de las proteínas PvERF001 y PvERF002 no significa que estas se encuentren en una forma activa induciendo a los genes de respuesta a estrés; por lo que se podría esperar que al igual que se ha observado en el DREB2A de *A. thaliana*; estás proteínas necesiten una modificación postraduccional para ser activas (Sakuma y cols. 2006).

PvERF001 **presenta un motivo de represión transcripcional.**

Otro dato interesante que encontramos que el FT *PvERF001* posee un motivo de represión EAR (**Fig.11**), este motivo se encuentra en proteínas tipo ERF pertenecientes al subgrupo BII de *A. thaliana*, esta compuesto por los aminoácidos L/F DLN L/F (x) P, y se localiza en la región C-terminal (Ohta y cols. 2001. Fujimoto y cols. 2000); Aunque se ha propuesto que la mayoría de los represores de la transcripción tipo ERF se unen a las cajas G, se ha observado que el represor transcripcional AtERF4 se une además al elemento DRE, (Strockinger y cols., 1997) por lo que es posible pensar que el FT *PvERF001* por poseer el motivo VAEIRE, se una al elemento en *cis* DRE; y de

esta manera impida la unión de los activadores de la transcripción como los DREB2, dando como resultado, la represión de la transcripción en los genes blanco. En este caso podríamos asumir que *PvERF001* estaría compitiendo por el sitio de unión a DRE con *PvERF002*.

PvERF001 podría estar regulando la transcripción de los genes mediados por DRE en respuesta a sequía. Para probar la especificidad de unión de la proteína *PvERF001* harían falta experimentos de movilidad en gel, utilizando la región promotora del gen *rd29A*, que es un gen que contiene dicho elemento (Sakuma y cols., 2002). Del análisis de la región promotora del *PvERF001*, encontramos que presenta elementos en *cis* tipo DRE y ABRE los cuales están involucrados en la expresión asociada con estrés por deshidratación, lo que sugiere que este la transcripción de este gen podría estar regulada por ABA y sequía y que además podría tener la capacidad de autorregularse.

Nuestra hipótesis de cómo actúan las proteínas *PvERF001* y el *PvERF002* en *P. vulgaris*, es la siguiente: en una etapa inicial durante el crecimiento, la planta se mantiene en un estado de alerta ante cualquier tipo de estrés; por lo que produce los FT *PvERF001 y PvERF002*, los cuales podrían modular una respuesta rápida en caso de estrés hídrico en etapas tempranas. Ya que la plántula se ha establecido de manera adecuada, los FT *PvERF001* y *PvERF002* dejan de sintetizarse, en plantas adultas la acumulación de estos genes estaría regulada de otra manera y sería modulada por el estrés.

Este trabajo provee una perspectiva de los mecanismos de regulación génica que operan en respuesta a sequía en plantas de interés agrícola como *P. vulgaris*; pretendemos que en un futuro sirva de ayuda para el entendimiento de las bases moleculares de respuesta a condiciones ambientales adversas, y como una herramienta biotecnológica para teniendo ya entendida la respuesta puedan desarrollarse métodos biotecnológicos para desarrollar plantas de frijol tolerantes a sequía.

Conclusiones.

- Se identificaron 30 genes que codifican para **F**actores **T**ranscripcionales tipo **AP2** para *Phaseolus vulgaris*

- Se encontro que 27 de los 30 genes identificados pertenecen a los subgrupos DREB y ERF

- Se seleccionaron 2 miembros del subgrupo DREB para un análisis más exhaustivo, los genes el *PvERF001* y el *PvERF002*. *PvERF001* posee un motivo de represión de la transcripción. Ambas proteínas poseen alta homología con miembros del grupo A5 .

- Se encontró que la los transcritos de los genes *PvERF001* y el *PvERF002* se inducen por déficit hídrico en tejidos de plantas adultas como hoja, raíz. Sin embargo en plántulas de 4 días su expresión no es modulada por sequía, sin embargo, los transcritos de ambos genes se acumulan abundantemente.

Referencias.

1. **Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, lwasaki T, Hosokawa C, y Shinoza k.** 1997 . Role of Arabidopsis MYC and MYB Homologs in Drought and Abscisic Acid-Regulated Gene Expression. The Plant Cell. **9**: 1859-1 868.
2. **Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, y Yamaguchi-Shinozaki K.** 2003. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. Plant Cell. **15**:63-78.
3. **Acevedo-Hernandez G, Leon P, y Herrera-Estrella, L**. 2005 Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4. Plant J., **43**:506-519.
4. **Alonso J, Stepanova A, y Leisse T.** 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. Science 301:653–657.
5. **Agarwal P, Reddy M, y Sopory K.** 2006. Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. Plant Cell. **25**: 1263-1274.
6. **Baker S, Wilhelm K, y Thomashow M.** 1994. The 5′-region of Arabidopsis thaliana cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. Plant Mol. Biol. 24: 701-713.
7. **Bennett M, y Leitch I.** 1995. Nuclear DNA amounts in angiosperms. Annals of Botany, **76**: 113-176.
8. **Bray E, Weretilnyk E, y Bailey-Serres W**. 2000 . Responses to Abiotic Stress. Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland, USA. 1158-1202.
9. **Bray E.** 1997. Plant responses to water deficit. Trends in plants science. **2**: 48-54.
10. **Bidwell R.** 1979. Fisiología vegetal. Botánica. México.
11. **Birnboim H, y Doly J** .1979 . A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Research, **7**: 1513-1523.
12. **Boutilier K, Offringa R, Sharma V, Kieft H, Ouellet T, Zhang L, Hattori J, Liu C, y Miki B.** 2002. Ectopic expression of BABY BOOM triggers a conversion from vegetative to embryonic growth. Plant Cell **14**:1737-1749.
13. **Broughton G, Hermández M, Blair S, Beebe P, Gepts, y Vanderleyden.** 2002. Beans (Phaseolus spp.) - Model Food Legumes. Plant & Soil. In press.
14. **Byzova M, Franken J, Aarts M, Almeida-Engler J, Engler G, Mariani C, Lookeren V, Campagne M, y Angenent G.**.1999. Arabidopsis STERILE APETALA, a multifunctional gene regulating inflorescence, flower, and ovule development. Genes Dev. **13**:1002-14.
15. **Colmenero-Flores J, Campos F, Garciarrubio A, y Covarrubias A. 1997.** Characterization of Phaseolus vulgaris cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. Plant Molecular Biology **35**:393-405.
16. **Cernac, A.; y Benning, C.** 2004. WRINKLED1 encodes an AP2/EREB domain protein involved in the control of storage compound biosynthesis in Arabidopsis.Plant J. **40**:575-585
17. **Cernac A, Andre C, Hoffmann-Benning S, y Benning C.** 2006. WRI1 is required for seed germination and seedling establishment.Plant Physiol. **141**:745-757.
18. **Chen M, Wang Q, Cheng X, Xu Z, Li L, Ye X, Xia L, y Ma Y.** 2007. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants. Biochem Biophys Res Commun. **353**:299-305.
19. **Chinnusamy V, Ohta M, Kanrar S, Lee B, Hong X, Agarwal M, y Zhu J.** 2003. ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. Genes Dev. **17**: 1043-1054.
20. **Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, y Kim S.** 2000 ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. J Biol Chem. **275**:1723-30.

21. **Church G, y Gilbert W.** 1984. Genomic sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **81**, 1991-1995.
22. **Cushman J, y Bohnert H.** 2000. Genoma approaches to plant stress tolerance. Curr. Opin. Plant biology. **3**: 117-124.
23. **Drews G, Bowman J, y Meyerowitz E.** 1991. "Negative regulation of the Arabidopsis homeotic gene AGAMOUS by the APETALA2 product." Cell **65**:991-1002.
24. **Dong J, Chen C, y Chen Z.** 2003. Expression profiles of the Arabidopsis WRKY gene superfamily during plant defense response. Plant Mol Biol. **51**:21-37
25. **Dubouzet J, Sakuma Y, Ito Y, Kasuga M, Dubouzet E, Miura S, Seki M, Shinozaki K, y Yamaguchi-Shinozaki K.** 2003. OsDREB genes in rice, Oryza sativa L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. Plant J. **33**:751-63.
26. **Elliot R, Betzner A, Huttner E, Oakes M, Tucker W, Gerentes D, Perez P, Smyth D**. 1996. AINTEGUMENTA, an APETALA-2 like gene of Arabidopsis with pleiotropic roles in ovule development and floral organ growth. Plant Cell. **8**: 155-168.
27. **Edwards A, Johnstone C, y Thompson C.** 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA. Nucleic Acids Research, **19**: 1349.
28. **Eulgem T, Rushton P, Robatzek S, y Somssich I.** 2000. The WRKY superfamily of plant transcription factors. Trends Plant Sci. **5**:199-206.
29. **Feinberg A, y Vogelstein B.** 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. **132**: 6-13.
30. **Finkelstein R, y Lynch T.** 2000. The Arabidopsis abscisic acid response gene ABI5 seedlings. Plant Cell Supplement. **14**: 15-45.
31. **Finkelstein R, Wang M, Lynch T, Rao S, y Goodman H**. 1998. The Arabidopsis abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. Plant Cell. **10**: 1043-1054.
32. **Fujimoto S, Ohta M, Usuia K, Shinshia H, y Takagia M**. 2000. Arabidopsis Ethylene-Responsive Element Binding Factors Act as Transcriptional Activators or Repressors of GCC Box–Mediated Gene Expression. Plant Cell. 12: 393-404.
33. **Fujita M, Fujita Y, Maruyama K, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Tran LS, y Yamaguchi-Shinozaki K.** 2004. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. Plant J. **39**:863-76.
34. **Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, y Parvez M.** 2005. AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA-signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. Plant cell **17**:3470-3480.
35. **Goerlich D**. 1998. Transport into and out of the cell nucleus. The EMBO Journal **17**: 2721-2727.
36. **Guiltinan M, Marcotte W, y Quatrano R.** 1990. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. Science. 250:267-71.
37. **Hicks G, y Raikhel N.** 1995. Protein import into the nucleus: an integrated view. Annu Rev Cell Dev Biol. **11**:155-88.
38. **Hiratsuka K, y Chua N**. 2006. Light regulated transcription in higher plants. Journal of Plant Research. 110: 131-139.
39. **Hirayama T, Shinozaki K.** 2007. Perception and transduction of abscisic acid signals: keys to the function of the versatile plant hormone ABA.Trends Plant Sci. 12, 343.
40. **Hobo T, Asada M, Kowyama Y, y Hattori T.** 1999. ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. Plant J. **19**:679-89.
41. **Horton P, y Nakai K.** 1997. Better prediction of protein cellular localization sites with the k nearest neighbors classifier. Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol. **5**:147-52.
42. **Hong J, Cheong Y, Nagao R, Bahk J, Key J, y Cho M**. 1995. Isolation of two soybean G-box binding factors which interact with a G-box sequence of an auxin-responsive gene. Plant J. **8**:199-211.
43. **Kagaya Y, Ohmiya K, y Hattori T.** 1999**.** RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants. Nucleic Acids Res. **27**:470-478.

44. **Kempter B, Luppa P, y Neumeir D.** 1991. A short procedure for Southern blotting on neutral and anionic membranes. Trends in genetics. **7**: 109-110.
45. **Lee B, Henderson D, y Zhu J.** 2005. The Arabidopsis cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. Plant Cell. **17**:3155-3175.
46. **Lee B, Park C, Kim S, Kim K, y Paek K.** 2006. In vivo binding of hot pepper bZIP transcription factor CabZIP1 to the G-box region of pathogenesis-related protein 1 promoter. Biochem Biophys Res Commun. **344**:55-62.
47. **Li X, Tian A, Luo G, Gong Z, Zhang J, y Chen S.** 2005. Soybean DRE-binding transcription factors that are responsive to abiotic stresses. Springer Berlin. **110**: 1355-1362.
48. **Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, y Shinozaki K.** 1998. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain, separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low temperature-responsive gene expression, respectively, in Arabidopsis. The Plant Cell **10**:1391–1406
49. **Liu L, White M, y MacRae T.** 1999. Transcription factors and their genes in higher plants functional domains, evolution and regulation. European Journal of Biochemistry. **262**:247–257
50. **Lorenzo O, Chico J, Sánchez-Serrano J, y Solano R.** 2004. JASMONATE INSENSITIVE1 encodes a MYC transcription factor essential to discriminate between different jasmonate-regulated defense responses in Arabidopsis. Plant Cell **16**:1938–50.
51. **Mahajan S, y Tuteja N.** 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. Arch Biochem Biophys. 444:139-58.
52. **Masaki T, Mitsui N, Tsukagoshi H, Nishii T, Morikami A, y Nakamura K. 2005.** ACTIVATOR of Spomin: LUC1/WRINKLED1 of Arabidopsis thaliana transactivates sugar-inducible promoters. Plant Cell Physiol. **46**:547-556.
53. **Marocco A, Lorenzoni C, y Fracheboud Y.** 2005. Chilling stress in maize. **50**: 571-580. INIST.
54. **Melotto M, Monteiro-Vitorello C, Bruschi A, y Camargo L.** 2005. Comparative bioinformatic analysis of genes expressed in common bean (Phaseolus vulgaris L.) seedlings. Genome **48**, 562-570.
55. **Miura K, Jin J, Lee J, Yoo C, Stirm V, Miura T, Ashworth E, Bressan R, Yun D, y Hasegawa P.** 2007. SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis. Plant Cell. **19**:1403-1414.
56. Mundy J, Yamaguchi-Shinozaki K, y Chua H. 1990. **Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice rab gene. Proct. Natl. Acad.** 87**: 1406–1410.**
57. **Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, y Shinshi H**. 2006. Genome-Wide Analysis of the ERF Gene Family in Arabidopsis and Rice. Plant Physiology **140**:411-432.
58. **Okamuro J, Caster B, Villarroel R, Montagu M, y Jofuku K.** 1997. The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in Arabidopsis. Proc Natl Acad Sci U S A. **94**:7076-81
59. **Orengo C, Jones D, y Thornton J.** 2002. Bioinformatics Genes, Proteins and Computers**.** Routledge, UK. 29-33.
60. **Page R.**1996. TreeView: An application to display phylogenetic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences, **12**: 357-358.
61. **Peng C, Agarwal M, Ohta M, Guo Y, Halfter W, y Zhu J.** 2005. Role of an Arabidopsis AP2/EREBP-Type Transcriptional Repressor in Abscisic Acid and Drought Stress Responses. The Plant Cell **17**:2384-2396
62. **Qin F, Sakuma Y, Tran L, Maruyama K, Kidokoro S, Fujita Y, Fujita M, Umezawa T, Sawano Y, Miyazono K, Tanokura M, Shinozaki K, y Yamaguchi-Shinozaki K.** 2008. Arabidopsis DREB2A-interacting proteins function as RING E3 ligases and negatively regulate plant drought stress-responsive gene expression. Plant Cell. **20**:1693-707.
63. **Ramírez M, Graham M, Blanco-López L, Silvente S, Medrano-Soto A, Blair M, Hernández G, Vance C, y Lara M.** 2005. Sequencing and analysis of common bean ESTs. Building a foundation for functional genomics. Plant Physiol. **137**:1211-27.

64. **Razem F, Kereamy A, Abrams S, y Hill R.** 2006. The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. Nature 439, 290-294
65. **Riechmann J, Heard J, Martin G, Reuber L, Jiang J, Keddie L, Adam O, Pineda O, Ratcliffe R, Samaha R, Creelman M, Pilgrim P, Broun Z, Zhang D, Ghandehari B, Sherman K .**2000. Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes**. 290**: 2105 – 2110.
66. **Swamy PM, Smith B. 1999.** Role of abscisic acid in plant stress tolerance. Current Science. 76:1220–1227.
67. **Sambrook J, Frisch E, y Maniatis T.** 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2da. Ed. Cold Spring Harbor laboratory Press.
68. **Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J, Abe H, Shinozaki K, y Yamaguchi-Shinozaki K.** 2002. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of Arabidopsis DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. Biochemical and Biophysical Research Communications. **290**:998-1009.
69. **Sakuma Y, Maruyama K, Qin F, Osakabe Y, Yuriko, Shinozaki K, y Yamaguchi-Shinozaki K.** 2006. Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression. PNAS. **103**: 18822-18827.
70. **Seki M, Narusaka M, Abe H, Kasuga M, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Hayashizaki Y, y Shinozaki K.** 2001. Monitoring the expression pattern of 1300 Arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. Plant Cell. **13**:61-72.
71. **Seki M, Narusaka M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oono Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Yamaguchi-Shinozaki K, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki Y, Shinozaki K.** 2002. Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. **31**:279-92.
72. **Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, y Shinozaki K.** 2003. Molecular responses to drought, salinity and frost: common and different paths for plant protection. Curr Opin Biotechnol. 14(2):194-9.
73. **Shen Q y Ho T.1995. Functional** Dissection of an Abscisic Acid **(**ABA**)-**Inducible Gene Reveals Two Independent ABA**-**Responsive Complexes Each Containing a G-Box and a Novel cis-Acting Element. The Plant cell. 7: 295-307.
74. **Shen Q, Zhang P, Ho T.** 1996. Modular nature of abscisic acid ABA response complexs: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barely. Plant Cell. **8**:1107-1119.
75. **Shen Y, Wang X, Du S, Cao Z, Shang Y, Wang, Peng C, Yu C, Zhu S, Fan C, y Zhang D.** 2006. The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. Nature **443**, 823-826
76. **Shinozaki K.** 2004. A dehydration-induced NAC protein, RD26, is involved in a novel ABA-dependent stress-signaling pathway. The Plant Journal **39**: 863–876.
77. **Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K y Seki M**. 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. Curr Opin Plant Biol. **5**:410-417.
78. **Soederman E, Brocard I, Lynch T, y Finkelstein R.** 2000. Regulation and function of the Arabidopsis ABA-insensitive4 gene in seed and abscisic acid response signaling networks. Plant Physiol. **124**:1752-1765.
79. **Sohn K, Lee S, Jung H, Hong J, y Hwang B.** 2006. Expression and functional roles of the pepper pathogen-induced transcription factor RAV1 in bacterial disease resistance, and drought and salt stress tolerance. Plant Molecular Biology **61**:897–915.
80. **Song C, Agarwal M, Ohta M, Guo Y, Halfter U, Wang P, y Zhu J.** 2005. Role of an Arabidopsis AP2/EREBP-type transcriptional repressor in abscisic acid and drought stress responses. Plant Cell. **17**:2384-96.
81. **Stockinger E, Gilmour S, y Thomashow M.** 1997. Arabidopsis thaliana CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **94**: 1035-1040.

82. **Thompson J, Higgins D, y Gibson T.** 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. **22**:4673-4680.
83. **Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, y Yamaguchi-Shinozaki K.** 2000. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. PNAS. **97**:10: 11632- 11637.
84. **Yadav V, Mallappa C, Gangappa S, Bhatia S, y Chattopadhyay S.** 2005.A basic helix-loophelix transcription factor in Arabidopsis, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. Plant Cell **17**:1953–66
85. **A. Yamaguchi-Shinozaki K, y Shinozaki K.** 1993. Arabidopsis DNA encoding two desiccation-responsive rd29 genes. Plant Physiol. **101**:1119-1120.
86. **B. Yamaguchi-Shinozaki, K, y Shinozaki K.** 1993. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of Arabidopsis thaliana and analysis of its promoter in transgenic plants. Mol. Gen. Genet. **236**:331-340.
87. **C. Yamaguchi-Shinozaki K, y Shinozaki K.** 1993. The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of rd22, a gene responsive to dehydration stress in Arabidopsis thaliana. Mol. Gen. Genet. **238**:17-25
88. **Yamaguchi-Shinozaki K, y Shinozaki K.** 1994. A novel cis-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. Plant Cell **6**:251-264
89. **Yamaguchi-Shinozaki K, y Shinozaki Kazuo.** 2000. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. Curr Opin Plant Biol. **3**:217-223
90. **Yamaguchi-Shinozaki K, y Shinozaki Kazuo.** 2005. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold- stress- responsive promoters. Trends in Plant Science. **10**: 88-94
91. **Yamaguchi- Shinozaki K, y Shinozaki Kazuo.** 2006. Transcriptional regulatory Networks in cellular responses and tolerance to Dehydration and Cold Stresses. Plant boil. **57**: 781-803.
92. **Yamasaki K, Kigawa T, Inoue M, Tateno M, Yamasaki T, Yabuki T, Aoki M, Seki E, Tomo Y, Hayami N, Terada T, Shirouzu M, Osanai T, Tanaka A, Seki M, Shinozaki K, y Yokoyama S.** 2004. Solution structure of the B3 DNA binding domain of the Arabidopsis cold-responsive transcription factor RAV1. Plant Cell **16**:3448-3459.
93. **Wray G, Hahn M, Abouheif E, Balhoff J, Pizer M, Rockman M, y Romano L**. 2003**.** The Evolution of Transcriptional Regulation in Eukaryotes. Mol Biol Evol. 20**: 1377-**1419.
94. **Xu Z, Ma Y, Cheng X, Chen M, y Li L**. 2005. Isolation and functional identification of AP2/EREBP transcriptional factor from wheat under abiotic stress. Datos no publicados.
95. **Zhang G, Chen M, Chen X, Xu Z, Guan S, Li LC, Li A, Guo J, Mao L, Ma Y.** 2008. Phylogeny, gene structures, and expression patterns of the ERF gene family in soybean (Glycine max L.). J Exp Bot. 15:4095-107.