



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**Instituto de Biotecnología**

ANÁLISIS MOLECULAR DE LA FAMILIA DE GENES TIPO *LEA18* DE *Arabidopsis thaliana*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
WENDY PADILLA LÓPEZ

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Francisco Campos Álvarez (IBT)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Patricia León Mejía (IBT), Baltazar Becerril Luján (IBT)

MÉXICO, D. F. octubre, 2013



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.



**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

OF.PMDCB. IBT.235.2013

**DR. ISIDRO ÁVILA MARTÍNEZ**  
Dirección General de Administración Escolar, UNAM  
**PRESENTE**

Por medio del presente me permito informar a usted que en la reunión del día 30 de mayo del 2013 el Subcomité Académico acordó nombrar el siguiente jurado para Examen de Maestría en Ciencias de la IQ. **PADILLA LÓPEZ WENDY**, con No.de cuenta **500043424** con la tesis titulada, "**Análisis molecular de la familia de genes tipo LEA18 de Arabidopsis thaliana**" dirigida por el **Dr. Francisco Campos Álvarez**

PRESIDENTE	Dr.	Federico Sánchez Rodríguez
SECRETARIO	Dr.	José Fernando Lledias Martínez
VOCAL	Dr.	Mario Ramírez Yañez
VOCAL	Dr.	Gladys Cassab López
VOCAL	Dr.	José Luis Reyes Taboada

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cuernavaca, Mor; a 02 de octubre 2013  
COORDINADOR DE LA ENTIDAD ACADÉMICA

**DRA. CLAUDIA LIDYA TREVIÑO SANTA CRUZ**  
C.c.p.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México, la máxima casa de estudios del país.

Al Instituto de Biotecnología, por permitirme realizar en sus instalaciones mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por su apoyo económico.

Al Dr. Francisco Campos Álvarez, por su asesoramiento.

A la Dra. Alejandra Covarrubias, por permitirme estar en su grupo.

A mis compañeros de laboratorio, por su apoyo y consejos.

A Marina, Sonia, Adriana R. y Paco, por hacerlo todo más agradable.

A Lizpa, por enseñarme todo lo que sabía de plantas transgénicas.

A Pepe, Adriana G. y Rosy, por sus consejos.

A Adriana Monserrat y a Gloria, por ser tan eficiente.

A todas las personas que me ayudaron, apoyaron y acompañaron durante la maestría, mis más sinceras y eternas GRACIAS.

*Este trabajo se lo dedico con todo mi amor a mis padres, Raquel y Daniel, a mis hijos, Ana Paula y Daniel Alberto y a mi esposo Alberto, por ser mis pilares, mi apoyo incondicional y mi inspiración para seguir adelante.*

*A mi tía Conchita, porque siempre tendrás un lugar especial en mi corazón.*

*A todos, todos mis familiares y amigos, porque siempre hemos estado juntos, en las buenas y en las malas.*

*A la familia Aranda Pastrana, gracias por hacerme sentir parte de la familia.*

*A mis seres queridos cuyo recuerdo siempre estará conmigo.*

*Con cariño*

*Wendy*

# INDICE

	PÁGINA
LISTA DE TABLAS.....	III
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN.....	VII
ABSTRACT.....	VIII
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 La planta modelo <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	3
I.2 Estrés en plantas.....	3
I.2.1 Estrés osmótico.....	4
I.2.2 Sequía.....	5
I.3 La fitohormona ácido abscísico (ABA).....	6
I.4 Respuestas moleculares a estrés hídrico.....	8
I.5 Regulación de la expresión genética.....	11
I.6 Proteínas LEA.....	14
I.6.1 Grupos de proteínas LEA.....	15
I.6.2 El grupo 6. La proteína LEA18.....	17
I.6.3 Posibles funciones de las proteínas LEA.....	19
Hipótesis.....	20
Objetivos.....	20
II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
II.1 Material vegetal.....	21
II.2 Esterilización de semillas de <i>A. thaliana</i> .....	21
II.3 Tratamiento de estrés hídrico y aplicación de ABA.....	21
II.4 Análisis de bases de datos.....	22
II.5 Aislamiento y clonación de los genes <i>AtLEA18-1</i> y <i>AtLEA18-2</i> .....	22
II.6 Secuenciación.....	23
II.7 Marcaje de sondas.....	24
II.8 Análisis tipo “Southern” de los genes <i>AtLEA18-1</i> y <i>AtLEA18-2</i> .....	24
II.9 Aislamiento de RNA total y análisis tipo Northern.....	24
II.10 Clonación del gen <i>AtLEA18-1</i> en vectores de expresión de planta.....	25
II.11 Cruza triparental.....	25
II.12 Transformación de plantas de <i>A. thaliana</i> con <i>A. tumefaciens</i> por el método de infiltración.....	26
II.13 Método de selección de plantas transgénicas.....	26
II.14 Generación del anticuerpo anti- <i>AtLEA18-1</i> .....	27
II.14.1 Construcción de la proteína de fusión GST - <i>AtLEA18-1</i> .....	27

II.14.2 Purificación de la proteína de fusión.....	28
II.14.3 Generación del anticuerpo anti-AtLEA18-1.....	29
II.15 Cuantificación y titulación de la proteína AtLEA18-1.....	29
II.16 Extracción de proteínas.....	30
II.17 Ensayos tipo Western.....	30
II.18 Inmunopurificación del anticuerpo.....	31
III. RESULTADOS .....	32
III.1 Identificación de proteínas similares a PvLEA18 en <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	32
III.2 Identificación de elementos <i>cis</i> en los promotores de los genes de la familia <i>AtLEA18</i> .....	35
III.3 Identificación de genes homólogos a <i>PvLEA18</i> en otras plantas.....	38
III.4 Análisis de la expresión de los genes <i>AtLEA18</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i> ...	40
III.4.1 Aislamiento y clonación de los ORFs de los genes <i>AtLEA18-1</i> y <i>AtLEA18-2</i> .....	40
III.4.2 Análisis del patrón de hibridación entre los genes <i>AtLEA18</i> .....	41
III.4.3 Análisis de la expresión de los genes <i>AtLEA18</i> en <i>A. thaliana</i> .....	42
III.5 Obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan el gen <i>AtLEA18-1</i> ...	44
III.5.1 Sobreexpresión del gen <i>AtLEA18-1</i> en plantas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	44
III.5.2 Determinación de los niveles de transcrito del transgen <i>AtLEA18-1</i> en las líneas transgénicas.....	47
III.6 Análisis de la sobreexpresión de la proteína AtLEA18-1 en plantas transgénicas de <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	49
III.6.1 Detección de la proteína AtLEA18-1 con el anticuerpo anti-PvLEA18.....	49
III.6.2 Generación de anticuerpos dirigidos contra la proteína AtLEA18-1....	52
III.6.3 Detección de la proteína AtLEA18-1 en plantas.....	55
IV. DISCUSIÓN.....	58
V. CONCLUSIONES.....	61
VI. PERSPECTIVAS.....	62
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	63
VIII. PÁGINAS WEB CONSULTADAS .....	80

## LISTA DE TABLAS

	PÁGINA
1. Oligos diseñados para la amplificación de los cDNAs de los genes <i>AtLEA18-1</i> y 2 y los propuestos para el aislamiento del gen <i>AtLEA18-3</i> .....	23
2. Comparación de los porcentajes de identidad entre las secuencias nucleotídicas de <i>AtLEA18</i> y <i>PvLEA18</i> , usando el programa GAP del paquete GCG.....	33
3. Comparación de los porcentajes de similitud/identidad entre las secuencias de aminoácidos de <i>AtLEA18</i> y <i>PvLEA18</i> , usando el programa GAP del paquete GCG.....	33
4. Composición de aminoácidos en porcentaje en número de cada una de las proteínas <i>AtLEA18</i> y de su homóloga <i>PvLEA18</i> .....	34
5. Características de las proteínas similares a <i>PvLEA18</i> encontradas en <i>A. thaliana</i> .....	35
6. Ubicación de los elementos <i>cis</i> encontrados en las posibles regiones promotoras y 3' -UTR de la familia de genes <i>AtLEA18</i> .....	36
7. Reseña de la transformación y experimentos de selección de plantas transgénicas.....	46
8. Porcentaje de germinación de plantas transgénicas de <i>A. thaliana</i> generación T <sub>1</sub> .....	47

## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
1. Factores de estrés ambiental.....	4
2. Procesos que suceden durante las diferentes etapas del desarrollo de la semilla	8
3. Posibles funciones de los productos génicos inducibles por estrés hídrico en plantas.....	10
4. Vías de transducción de señales en respuesta a deshidratación y bajas temperaturas.....	13
5. Estrategia de clonación del gen <i>AtLEA18-1</i> dentro del plásmido pGEX1.....	28
6. Alineamiento de las secuencias homólogas a la proteína PvLEA18 encontradas en <i>A. thaliana</i> .....	33
7. Localización de posibles elementos que actúan en <i>cis</i> en las regiones 5' y 3' de los genes <i>AtLEA18</i> .....	37
8. Alineamiento de las secuencias homólogas a la proteína PvLEA18 encontradas en otras plantas.....	38 y 39
9. Diagrama de la clonación del gen <i>AtLEA18-1</i> dentro del plásmido pKS <sup>+</sup> y los oligonucleótidos específicos diseñados.....	40
10. Diagrama de la clonación del gen <i>AtLEA18-2</i> dentro del plásmido pKS <sup>+</sup> y los oligonucleótidos específicos diseñados.....	41
11. Análisis del patrón de hibridación entre los genes <i>AtLEA18</i> .....	42
12. Determinación de los niveles de acumulación del transcrito de los genes <i>AtLEA18</i> durante sequía y en la presencia de ABA.....	43
13. Diagrama de la clonación del gen <i>AtLEA18-1</i> en el plásmido pBin35S (A) y en el plásmido pBin3x35S (B).....	45
14. Análisis de la sobreexpresión del gen <i>AtLEA18-1</i> en plantas transgénicas de la generación T <sub>1</sub> .....	48
15. Inmunodetección de las proteínas PvLEA18 y AtLEA18-1 en plantas.....	50
16. Inmunodetección de la proteína PvLEA18 y AtLEA18-1 con el anticuerpo anti-PvLEA18 inmunopurificado.....	51
17. Análisis de extractos proteicos totales en gel de SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomassie.....	53
18. Titulación del anticuerpo anti-AtLEA18-1 e inmunodetección de la proteína AtLEA18-1.....	54
19. Inmunodetección de la proteína AtLEA18-1 en plantas.....	55 y 56
20. Segunda inmunodetección de la proteína AtLEA18-1.....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABA: fitohormona ácido abscísico.

ABRE: ABA-responsive elements (elemento de respuesta a ABA).

AREB/ABF: ABA-responsive element binding protein/ABRE-binding factor (factores de transcripción que se unen a ABRE).

BCIP/NBT: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/cloruro de tetrazolio nitroazul.

bHLH: basic helix-loop-helix proteins (proteínas básicas de hélice-vuelta-hélice).

BSA: bovine serum albumin (albúmina sérica bovina).

bZIP: basic-domain leucine-zipper transcription factors (factores de transcripción con un dominio básico unido a un motivo [cremallera] de leucina).

CBF: C-repeat binding factors (factores de unión a C repetido).

*COR*: cold regulated gene (gen regulado por frío).

DRE: dehydration-responsive element (elemento de respuesta a deshidratación).

DREB: DRE-binding proteins (proteínas que se unen a DRE).

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilendiaminotetraacético).

EST: expressed sequence tag (fragmento de secuencia expresada).

ERF: ethylene-responsive-element-binding factors (factores que se unen al elemento que responde a etileno).

GFP: green fluorescent protein (proteína verde fluorescente).

GM: medio de germinación.

GST: proteína glutatión-S-transferasa.

GUS: reporter gene  $\beta$  glucuronidase (gen reportero de  $\beta$  glucuronidasa).

IPTG: isopropil-1-tio- $\beta$ -D-galactósido.

Lb: medio de cultivo Luria-Bertani.

LEA proteins: proteínas abundantes de la embriogénesis tardía.

MES: 2-(*N*-morpholino)ethanesulfonic acid (buffer MES).

NAC: N-acetyl cysteine (acetilcisteína).

NLS: nuclear localization signal (señal de localización nuclear).

NOS: nopaline sintase gene (gen de nopalina sintasa).

PBS: phosphate buffered saline (buffer fosfato salino).

PCR: Polymerase Chain Reaction (reacción en cadena de la polimerasa).

PSE: buffer fosfato-SDS-EDTA.

Promotor 35S: promotor constitutivo fuerte del Virus del Mosaico de la coliflor 35S

RNAm: ácido ribonucleico mensajero.

Sales MS: sales Murashige-Skoog.

SDS: sodium dodecyl sulfate (dodecil sulfato de sodio).

SDS-PAGE: sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio).

SSC: saline-sodium citrate (citrato de sodio salino).

TBS: tris-buffered saline (tris solución salina tamponada).

TCA: trichloroacetic acid (ácido tricloroacético).

TRIS: tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer (buffer tris).

UTR: untranslated región (región del gen no traducida).

## RESUMEN

Las plantas frecuentemente se encuentran bajo condiciones ambientales fluctuantes que pueden afectar su crecimiento, desarrollo y viabilidad. El estrés causado por un déficit o exceso de las condiciones químicas o físicas se denomina estrés abiótico. Un tipo de estrés abiótico, el estrés hídrico provoca cambios que van desde alteraciones fisiológicas y morfológicas, hasta cambios en la expresión génica. Algunos de los genes cuya expresión es inducida por el déficit hídrico son los que codifican para las proteínas abundantes de la embriogénesis tardía, *lea* (del inglés: Late Embryogenesis Abundant). Las proteínas LEA se agrupan en 6 familias o grupos de acuerdo a la homología en sus secuencias de aminoácidos. Nuestro grupo ha identificado y caracterizado el grupo 6 o grupo LEA18 en fríjol. Aunque la familia LEA18 ha sido caracterizada en fríjol, poco se conoce de ella en otros vegetales; aprovechando que para algunos de ellos se conoce la secuencia completa de su genoma, como sería el caso de *Arabidopsis thaliana*, se planteó el objetivo de identificar y caracterizar la familia de LEA18 en *A. thaliana*. Como primer punto se llevó a cabo una búsqueda de secuencias homólogas a *PvLEA18* y se encontró que el genoma de *Arabidopsis* posee 3 genes similares a *PvLEA18*; estos tres genes residen en el cromosoma 2 y dos de ellos se encuentran adyacentes, lo cual sugiere un evento reciente de duplicación. Además, hemos detectado genes ortólogos a *LEA18* en otras plantas, incluidas monocotiledóneas y gimnospermas.

También hemos determinado los patrones de acumulación de transcrito para algunos de los miembros de esta familia y hemos encontrado que la familia *AtLEA18* se expresa diferencialmente en la planta: *AtLEA18-1* se expresa en semilla y es inducida fuertemente por ABA; *AtLEA18-2* se induce abundantemente por sequía, aunque no se expresa en semilla y su expresión es inducida ligeramente por ABA y se expresa en condiciones control.

Para determinar el posible papel de la familia *AtLEA18* en la tolerancia a la sequía se generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* sobreexpresando el gen *AtLEA18-1*, sin embargo, no pudimos detectar la sobreexpresión del transgene.

## ABSTRACT

Water is an essential element for living organisms, such that various responses have evolved to withstand water deficit in all living species. The study of these responses in plants has had particular relevance given the negative impact of water scarcity on agriculture. Among the molecules highly associated with plant responses to water limitation are the so-called late embryogenesis abundant (LEA) proteins. These proteins are ubiquitous in the plant kingdom and accumulate during the late phase of embryogenesis and in vegetative tissues in response to water deficit. Seven groups of LEA proteins have been described on the basis of similarities in their amino acid sequence and conserved motifs. With the exception of group 5, LEA proteins are highly hydrophilic, contain a high percentage of glycine, alanine, serine, and threonine, and lack or contain few tryptophan and cysteine residues. It is predicted from their amino acid sequences that they are intrinsically unstructured proteins, and experimentally confirmed for a few of them in aqueous solution.

In this work, we report the characterization of LEA proteins from group 6 proteins from *Arabidopsis thaliana*. We found that the *Arabidopsis* genome encodes three genes of this family, named *AtLEA18-1* (**At2g23110**), *AtLEA18-2* (**At2g23120**) and *AtLEA18-3* (**At2g33690**). *AtLEA18-1* and *AtLEA18-2* are organized in tandem, suggesting a recent gene duplication event. We have identified LEA proteins from group 6 in monocots, eudicots and gymnosperms; however, we did not find LEA 6 family in seedless plants. Furthermore, we have determined the transcript accumulation patterns of *Arabidopsis* LEA 6 family: *AtLEA18-1* is expressed in seed and is ABA-responsive; *AtLEA18-2* is expressed in well-irrigated plants, it is not detected in seed, and transcriptional induction in response to exogenous ABA is weak. The expression of *AtLEA18-3* is only detected in pollen grains.

To define the possible function of AtLEA6 family in drought tolerance we generated transgenic plants expressing a 35S-*AtLEA18-1* construct, however, we failed to detect over-expression of this gene.

# I. INTRODUCCIÓN

Los tipos diferentes de estrés abióticos, tales como la sequía, la salinidad, las temperaturas extremas, la toxicidad química y el estrés oxidativo son serias amenazas para la agricultura y son la principal causa de las pérdidas de cultivos en el mundo, reduciendo en más del 50% la producción promedio de la mayoría de ellos (Boyer, 1982; Bray *et al.*, 2000). El estrés abiótico da lugar a una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares que afectan de manera negativa el crecimiento y la productividad de las plantas (Wang *et al.*, 2001a).

Una condición de estrés no es necesariamente causada por un factor externo, se puede originar en las diferentes etapas de desarrollo de las plantas; en la mayoría de las mismas hay disminuciones transitorias en el contenido relativo de agua en alguna etapa de su vida y algunas también producen estructuras altamente tolerantes a la desecación, tales como las semillas, esporas o polen (Ingram y Bartels, 1996).

Aunque de manera general la síntesis de proteínas disminuye durante el estrés hídrico, existe un grupo de genes cuya transcripción aumenta en respuesta a la sequía (Ingram y Bartels, 1996); tal es el caso de los genes que codifican para las proteínas abundantes de la embriogénesis tardía o proteínas **LEA** (**L**ate **E**mbryogenesis **A**bundant). Estas proteínas se acumulan en altos niveles durante la etapa de desecación de las semillas (Galau *et al.*, 1986; Baker *et al.*, 1988; Bray, 1993) y se ha demostrado que la expresión de algunos genes *LEA* es regulada por la fitohormona ácido abscísico, ABA (Battaglia y cols., 2008; Tunnaclyfe y Wise, 2007; Shih y cols., 2008; Bies-Ethève y cols., 2008; Busk y Pagès, 1998; Leung y Giraudat, 1998). Algunas de las proteínas LEA son altamente hidrofílicas, con un alto contenido glicinas y de aminoácidos cargados, no poseen una estructura globular, por lo que son resistentes a la coagulación por efecto de altas temperaturas y carecen o presentan porcentajes muy bajos de cisteínas y triptofanos (Hincha y Thalhammer, 2012; Dure, 1993).

El hecho de que los transcritos y proteínas LEA se acumulen en tejidos vegetativos de plantas sometidas a estrés hídrico y en estructuras altamente tolerantes a la desecación como las semillas y el polen, ha sugerido que las proteínas LEA podrían tener un papel protector, al mantener la integridad de algunas estructuras celulares o disminuir los efectos del estrés hídrico, al mantener un requerimiento hídrico celular mínimo (Dure, 1993a). Otras posibles

funciones de estas proteínas son el secuestro de iones (Dure, 1993b), la actividad de chaperona molecular (Close, 1996) y el transporte de proteínas nucleares durante estrés (Goday *et al.*, 1994). También se ha demostrado que la sobreexpresión del gen *HVA1*, el cual codifica para una proteína LEA tipo 3 de cebada, le confiere resistencia a estrés hídrico y salino a arroz (Xu *et al.*, 1996) y que la sobreexpresión de LE25, una proteína LEA de tomate del grupo 4 en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, le confiere resistencia a alta salinidad y congelamiento (Imai *et al.*, 1996).

En 1997, Colmenero-Flores y cols. encontraron en fríjol (*Phaseolus vulgaris*) una nueva proteína de 14 kilodaltons (kDa) que presenta características similares a las de otras proteínas del tipo LEA, a la que se ha denominado como PvLEA18. El transcrito y la proteína PvLEA18 se acumulan en semilla seca, en tejidos vegetativos sometidos a estrés hídrico y en plantas tratadas con ABA. Además, se ha encontrado que esta proteína también se acumula en tejido vegetativo bajo condiciones favorables de irrigación, particularmente en la región de elongación del hipocotilo. Por estas razones se ha clasificado a la PvLEA18 dentro de una nueva familia de LEAs, la del grupo 6 (Colmenero-Flores *et al.*, 1999; Battaglia y cols., 2008).

En experimentos posteriores se analizaron los patrones de expresión de las regiones no traducidas del gen *PvLEA18* fusionadas al gen reportero *GUS*, durante el desarrollo y en respuesta a déficit hídrico o ABA, en plantas transgénicas de *A. thaliana*. Los resultados muestran que los patrones de expresión del gen en las plantas transgénicas, sometidas a estrés hídrico o bien en condiciones de buena irrigación, son semejantes a los observados en plántulas de fríjol. Además, la región 3' del gen *PvLEA18* parece participar en la inducción de la expresión del gen durante el desarrollo y deshidratación pero no en respuesta a ABA y este efecto se da principalmente a través de una vía independiente de ABA. También la región promotora de 2058 pb, usada en las plantas transgénicas de *A. thaliana*, modula la expresión del gen durante desarrollo, en respuesta a deshidratación y en respuesta a ABA (Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001).

Se sabe muy poco acerca de la función del grupo de proteínas LEA18, aunque se ha propuesto que podría funcionar como un osmoprotector de las regiones maduras del hipocotilo o como una molécula atrapadora de agua durante la expansión celular (Colmenero-Flores *et al.*, 1999). Estas observaciones nos llevan a hipotetizar que posiblemente la sobreexpresión de

un gen tipo *LEA18* en plantas y en organismos heterólogos podría conferir algún grado de tolerancia a estrés hídrico. Por lo anterior, se plantea la presente investigación.

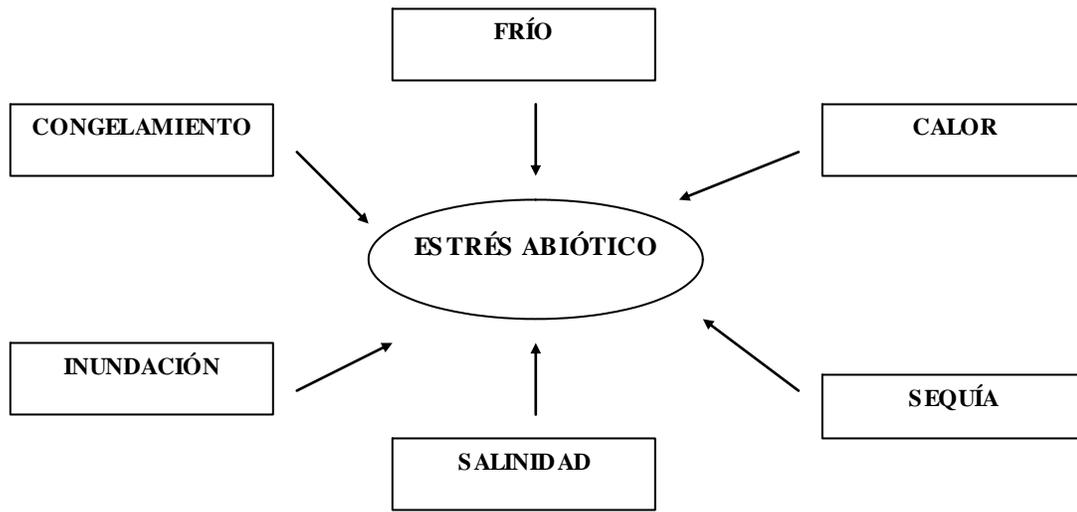
### **I.1 La planta modelo *Arabidopsis thaliana***

Es una planta silvestre que pertenece a la familia de las *Brassicaceae*; debido a que nunca crece más de 30 centímetros, es fácil mantener una gran cantidad de plantas en el laboratorio bajo condiciones controladas y cosechar semilla madura en seis semanas. Sus flores son hermafroditas y normalmente se autopolinizan; una sola flor puede producir de 30 a 50 semillas y la planta completa miles de ellas. Estas características (y otras) la han convertido en la planta ideal para el aislamiento y la caracterización genética de mutantes.

Es una planta diploide y su genoma (número de cromosomas haploides = 5) es relativamente pequeño, aproximadamente  $100\text{--}120 \times 10^6$  pb y tiene algunas secuencias de DNA repetitivas dispersas. Los ecotipos son líneas de laboratorio que han sido obtenidas de diferentes sitios geográficos. Sólo algunos de los 300 ecotipos son usados rutinariamente para mutagénesis y mapeo molecular, entre los que se encuentran *Landsberg erecta* (*Ler*), *Columbia* (*Col*), *Niederzenz* (*Nd*) y *Wassilewskija* (*Ws*). *A. thaliana* puede ser infectada eficientemente por *Agrobacterium tumefaciens* y se pueden obtener fácilmente plantas transgénicas, las cuales son muy útiles para la expresión de genes y estudios de regulación (Westhoff *et al.*, 1998).

### **I.2 Estrés en plantas**

Las plantas frecuentemente se enfrentan a situaciones que producen diferentes tipos de estrés, el cual se puede definir como aquella condición que afecta desfavorablemente el crecimiento, desarrollo y productividad de los diferentes organismos. El estrés puede ser biótico, el cual puede ser originado por otros organismos, o abiótico, debido a condiciones ambientales adversas, como la inundación, la sequía, altas o bajas temperaturas, excesiva salinidad del suelo, la carencia de nutrientes minerales y demasiada o poca luz, entre otros (**Fig. 1**; Bray *et al.*, 2000). Sin embargo, la mayoría de las plantas, especialmente las de interés agrícola, no toleran la desecación, pero tienen el potencial para desarrollar esa tolerancia.



**Figura 1. Factores de estrés ambiental.** Condiciones adversas para un desarrollo vegetal favorable que dan como resultado un estrés abiótico.

Los mecanismos que permiten a la planta sobrevivir al estrés son llamados mecanismos de resistencia y le permiten tolerar o evitar el estrés. La respuesta de las plantas a las condiciones ambientales adversas depende de la severidad y duración del estrés, la etapa de desarrollo de la planta afectada, el tipo de tejido y las interacciones entre diferentes tipos de estrés (Ingram y Bartels, 1996).

### **I.2.1 Estrés osmótico**

Algunas de las respuestas a diversos tipos de estrés se sobrelapan debido a la similitud de los cambios fisiológicos que ocurren cuando el organismo se somete a varios tipos de estrés; por ejemplo, el estrés osmótico puede ser causado por diferentes factores ambientales, incluyendo la sequía, desecación, sal y frío, que involucran problemas de disponibilidad de agua. El estrés osmótico afecta diferencialmente a los órganos vegetales o a diferentes regiones de crecimiento del mismo órgano (Vierling y Kimpel, 1992).

A nivel celular, un mecanismo de resistencia a este tipo de estrés es el ajuste osmótico, que consiste en una disminución del potencial hídrico en los tejidos vegetales, lo cual tiene como consecuencia la entrada de agua y por lo tanto, no se presenta una disminución en el turgor de la célula vegetal. El ajuste osmótico se da en las plantas a través de la biosíntesis de osmolitos orgánicos de bajo peso molecular y por la acumulación de iones, fundamentalmente  $K^+$  (Bohnert y Sheveleva, 1998). La acumulación de iones durante el ajuste osmótico ocurre principalmente en la vacuola, mientras que en el citoplasma se acumulan solutos que no afectan negativamente la funcionalidad de macromoléculas celulares. Estos solutos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular (osmolitos) como polioles (azúcares), metilaminas, aminoácidos libres y derivados de aminoácidos (Yancey *et al.*, 1982).

Se ha encontrado que diferentes organismos como plantas, bacterias, hongos y animales pueden sintetizar osmolitos compatibles en respuesta a un estrés osmótico (Yancey *et al.*, 1982). La acumulación de osmolitos compatibles tiene como consecuencia la osmoprotección, que está dada por la capacidad estabilizadora de algunos de estos solutos sobre macromoléculas como las proteínas y los sistemas de membrana celulares. Por ejemplo, la acumulación de prolina es responsable del ajuste osmótico en la punta de la raíz y le permite continuar su crecimiento cuando se encuentran bajo déficit hídrico (Voetberg y Sharp, 1991). Los osmolitos compatibles se caracterizan por no alterar la estructura y función de las macromoléculas cuando se acumulan en altas concentraciones. Se propone que estos osmolitos no interaccionan con sustratos y cofactores enzimáticos, ni afectan negativamente las interacciones entre las macromoléculas y el solvente (Yancey *et al.*, 1982).

### **I.2.2 Sequía**

Las plantas sufren de sequía o déficit hídrico en respuesta a un ambiente escaso de agua, en donde la tasa de transpiración de la planta excede a la toma de agua. En general, el estrés hídrico es una forma moderada de déficit hídrico (Bray, 1997) y la desecación es la forma extrema de deshidratación, cuando se pierde la mayoría del agua “libre” citoplásmica y la planta sobrevive sólo con el “agua unida”, asociada con la matriz celular. En el caso de que exista pérdida completa de agua libre, se habla de un proceso de desecación o deshidratación

(Hoekstra *et al.*, 2001). El déficit hídrico no sólo ocurre cuando hay poca agua en el ambiente, sino también por bajas temperaturas y por una elevada salinidad del suelo (Levitt, 1980).

El estrés por sequía induce varias respuestas bioquímicas y fisiológicas en las plantas; el déficit hídrico celular puede resultar en un aumento en la concentración de solutos, cambios en el volumen celular y en la forma de la membrana, alteración del gradiente de potencial hídrico, pérdida de la integridad de la membrana y desnaturalización de proteínas, entre otras cosas (Bray, 1997).

La tolerancia a la sequía se refiere a la tolerancia a una deshidratación moderada; cuando se habla de la tolerancia a la desecación o anhidrobiosis (vida sin agua), generalmente se refiere a la tolerancia que presenta el organismo a una deshidratación severa, cuando las moléculas que lo hidratan se pierden gradualmente (Hoekstra *et al.*, 2001).

### **I.3 La fitohormona ácido abscísico (ABA)**

El ácido abscísico (ABA) es una fitohormona presente en plantas vasculares y también ha sido detectada en musgos, en algas y hepáticas (Bray *et al.*, 2000). Algunos hongos patógenos producen ABA, como un metabolito secundario, por una vía completamente diferente a la que usan las plantas superiores (Neill *et al.*, 1982).

En general, ABA afecta la dormancia de las yemas; regula el desarrollo y germinación de semillas así como la adaptación de tejidos vegetativos a condiciones de estrés ambiental (Giraudat, 1995). ABA aumenta como resultado del estrés hídrico y tiene importantes papeles en la tolerancia de las plantas a la sequía, alta salinidad y frío (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

En tejidos vegetativos, ABA tiene varios papeles en las respuestas adaptativas a déficit hídrico, tales como el aumento en el radio de la raíz, la acumulación de osmolitos y la regulación de la expresión de varios de los genes inducidos por sequía que estabilizan estructuras celulares (por ejemplo, algunas de las proteínas LEA; Setter, 1997).

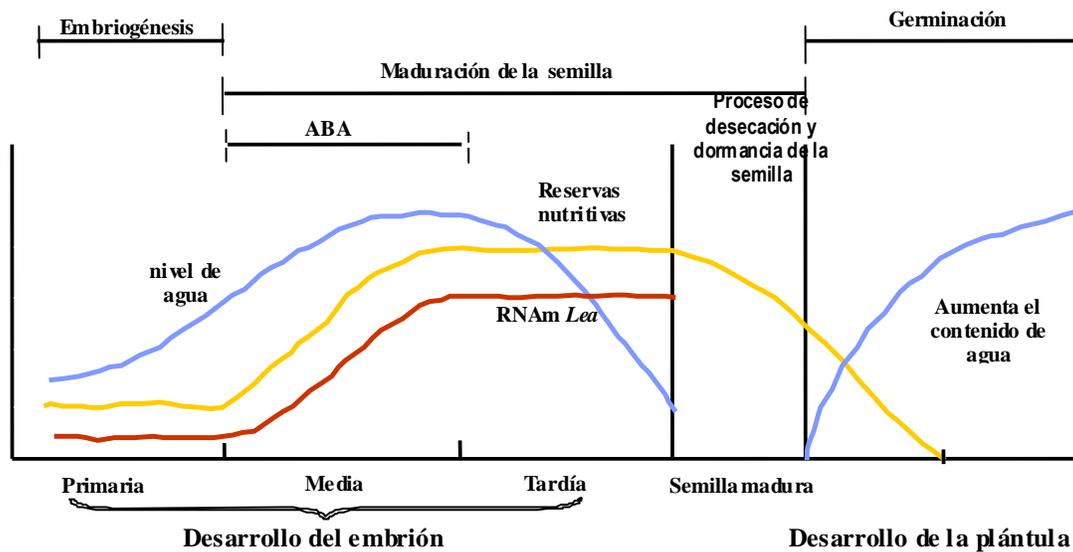
La síntesis de ABA es un evento normal durante el desarrollo vegetativo, especialmente en las últimas etapas de la formación de algunos órganos, como la semilla; ABA estimula la acumulación de ciertas proteínas y confiere dormancia a embriones durante la desecación. Los estudios indican que en plantas en sequía, el estado fisiológico que origina

un aumento en la síntesis de ABA es la pérdida de turgor celular en el punto de marchitez (Bray, 1993). La síntesis de ABA no solo es estimulada por déficit hídrico, sino también por enfriamiento (Lee *et al.*, 1995) y déficit de O<sub>2</sub> inducido por inundación (VanToai *et al.*, 1995).

Durante las condiciones de estrés, el aumento en los niveles de ABA inhibe la apertura y promueve el cierre estomático, reduciendo de esta manera la pérdida de agua ocasionada por la transpiración (MacRobbie, 1995). El poro estomático está formado por un par de células guarda; estas células poseen vías de transducción de señales redundantes para ABA y una de ellas involucra el aumento en las concentraciones de calcio intracelular. La activación de alguna de estas rutas (dependiente o independiente de Ca<sup>2+</sup>) es aparentemente suficiente para promover el cierre estomático y el uso diferencial de estas dos vías de transducción puede facilitar a la planta integrar factores ambientales tales como la temperatura y la disponibilidad de agua (Allan *et al.*, 1994). Las células guarda poseen al menos dos sitios de percepción de ABA involucrados en la regulación de la apertura estomática, uno localizado en la membrana plasmática y un segundo localizado intracelularmente (Leung y Giraudat, 1998).

Además, se sabe que ABA regula, en semilla y tejido vegetativo, algunos de los cambios fisiológicos a largo plazo que parecen involucrar, principalmente, modificaciones de la expresión génica a nivel transcripcional. ABA también es responsable de inducir la síntesis de algunas de las proteínas LEA (**Fig. 2**; Bray, 1993; Skriver y Mundy, 1990).

Las mutantes *aba* (con niveles de ABA endógeno reducidos) y *abi* (insensibles a ABA) han sido usadas para apoyar la hipótesis de que el ABA endógeno regula la expresión de un gran número de genes (Chandler y Robertson, 1994). La mayoría de estas mutantes muestran una pérdida excesiva de agua debido a los defectos en la regulación estomática, la cual lleva a un incremento en la tendencia a la marchitez. Igualmente, los genes que se regulan a través de ABA presentan en estas mutantes niveles muy bajos de expresión durante las diferentes condiciones de estrés y durante la embriogénesis (Giraudat *et al.*, 1994).



**Figura 2. Procesos que suceden durante las diferentes etapas del desarrollo de la semilla.** Los niveles altos de ABA están temporalmente correlacionados con el inicio de maduración y prevención de la germinación precoz durante la mitad del desarrollo del embrión. Nótese que la expresión de los genes *LEA* en la etapa de embriogénesis tardía correlaciona con los altos niveles de ABA (Skriver y Mundy, 1990; Rock y Quatrano, 1994; Arroyo, 2003).

#### I.4 Respuestas moleculares a estrés hídrico

El déficit hídrico da lugar a un conjunto de respuestas que comienzan con la percepción del estrés, el cual inicia con una cascada de transducción de señales y se manifiesta en cambios a nivel celular, fisiológico y de desarrollo. Es sorprendente descubrir que algunas de las respuestas a déficit hídrico son similares en especies tolerantes, tales como *Mesembryanthemum crystallinum* y *Craterostigma plantagineum* y en plantas de interés agrícola, tales como tomate y maíz o aún en la planta modelo *A. thaliana*.

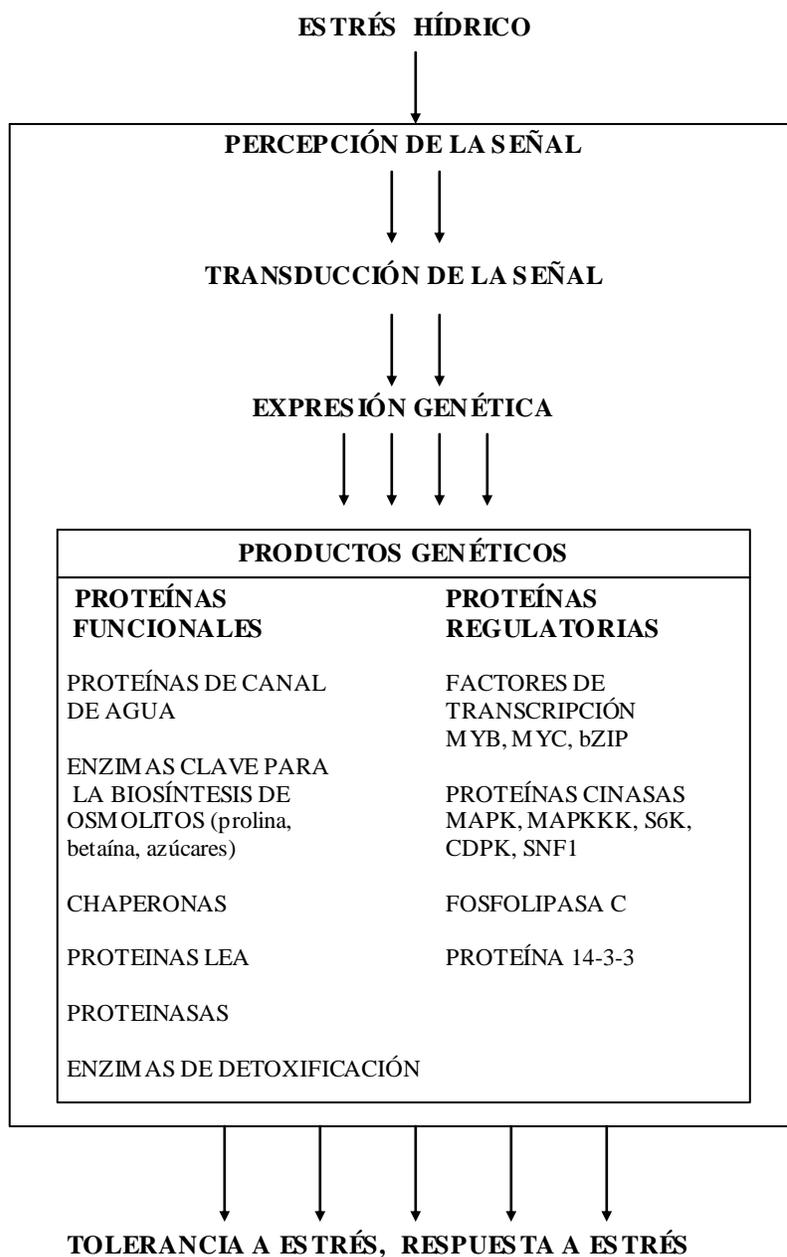
Los cambios en la expresión genética son fundamentales en las respuestas que ocurren durante el déficit hídrico y controlan algunas de las respuestas a corto y largo plazo. Algunos de los genes expresados durante el estrés pueden promover la tolerancia celular a deshidratación a través de funciones protectoras en el citoplasma, alteración del potencial

hídrico celular para promover la captación de agua, control de la acumulación de iones y mayor regulación de la expresión genética (Bray, 1993; Bray 1997).

Se han clasificado los productos genéticos inducidos bajo condiciones de estrés hídrico en dos grandes grupos. En el primero se encuentran las llamadas proteínas funcionales, que probablemente participan en la tolerancia a estrés; ejemplos de ellas son: las proteínas de canales de agua, involucradas en el movimiento de agua a través de las membranas, las enzimas requeridas para la biosíntesis de varios osmoprotectores (azúcares, prolina y glicin-betaína), proteínas que pueden proteger macromoléculas y membranas (proteínas LEA, osmotina, proteínas de anticongelamiento, chaperonas y proteínas de unión a RNAm), proteasas requeridas para el recambio de otras proteínas (tiol proteasas, proteasa Clp y ubiquitina) y enzimas de detoxificación (glutación S-transferasa, hidrolasa epoxisoluble, catalasa, superóxido dismutasa y ascorbato peroxidasa). En el segundo grupo se encuentran las proteínas reguladoras, como los factores proteicos involucrados en las vías de transducción de señales y las proteínas que afectan la expresión genética, como las proteínas cinasas, los factores de transcripción, PLC y proteínas 14-3-3 (**Fig. 3**; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

Las numerosas respuestas a déficit hídrico son controladas por un arreglo de genes con algunas funciones diferentes. Cuando la célula pierde agua, los procesos regulatorios son iniciados para ajustar el metabolismo celular a las nuevas condiciones. Al mismo tiempo, la inhibición del crecimiento y la alteración de las vías de desarrollo resultarán en cambios de la expresión genética. Se ha pensado que los genes inducidos durante condiciones de estrés hídrico funcionan no solo en proteger las células del déficit hídrico por la producción de importantes proteínas metabólicas, sino también en la regulación de genes para la transducción de señales en la respuesta a estrés.

La mayoría de los genes que son inducidos por sequía también responden a frío y viceversa, pero algunos sólo responden a sequía y otros sólo a frío, pero además hay genes que responden a sequía y/o frío que también son inducidos por la aplicación exógena de ABA; algunos reportes han descrito genes que son inducidos por sequía o frío pero no responden al tratamiento de ABA exógeno. Esto indica la presencia de cascadas de transducción de señales dependientes e independientes de ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997).



**Figura 3. Posibles funciones de los productos génicos inducibles por estrés hídrico en plantas.**

## I.5 Regulación de la expresión genética

Las respuestas al estrés en plantas están reguladas por varias vías de señalización y hay un traslape significativo entre los patrones de expresión genética, que son inducidos en las plantas en respuesta a diferentes tipos de estrés (Knight y Knight, 2001). La inducción genética por estrés ocurre primeramente a nivel de la transcripción y la regulación de los patrones de expresión temporales y espaciales de los genes específicos de estrés es una parte importante de las respuestas vegetales a estrés (**Fig.4**). Las plantas dedican una gran parte de su capacidad genómica para inducir factores de transcripción, como en el caso de *Arabidopsis*, cuyo genoma codifica para poco más de 1500 factores. Estos factores frecuentemente pertenecen a grandes familias de genes, los cuales en algunos casos son únicos en plantas (Riechmann *et al.*, 2000). Hay varias familias de factores de transcripción entre los que se encuentran (**Fig.4**): los factores que se unen al elemento que responde a etileno (ethylene-responsive-element-binding factor, ERF), las proteínas que se unen a DRE (DRE-binding protein, DREB), las proteínas básicas de hélice-vuelta-hélice (basic helix-loop-helix, bHLH), la familia NAC, la familia de factores de transcripción de homeodominio, las cremalleras de leucina de dominio básico (basic-domain leucine-zipper, bZIP), las proteínas WRKY y los factores MYC y MYB (Riechmann *et al.*, 2000).

Algunos de los genes cuya transcripción es inducida por sequía y frío pero no responden a ABA exógeno son: *rd29A/lti78/cor78*, *kin1*, *cor6.6* y *cor47*. Estos genes poseen una secuencia conservada de nueve pares de bases **TACCGACAT** en su región promotora llamada **DRE** (dehydration-responsive element, identificado en 1994 por Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki). Este elemento es esencial y actúa *in cis* para su regulación en respuesta a deshidratación. Motivos similares llamados CRT (C repetido) y otros elementos que responden a bajas temperaturas, los cuales incluyen el motivo **CCGAC**, que forma el núcleo de la secuencia DRE, se han encontrado en las regiones promotoras de genes inducibles por frío. Los factores de transcripción que pertenecen a la familia ERF/AP2 (factor de unión al elemento que responde a etileno/ apétala2) y que se unen a DRE/CRT son llamados DREB1A/CBF3, DREB1B/CBF1 y DREB1C/CBF2. La vía DREB1/CBF tiene un papel clave en la regulación de la expresión genética independiente de ABA en respuesta a sequía y frío (**Fig.4**) (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000).

Kim y colaboradores (2002) también reportaron que la expresión genética inducida por frío a través de DRE/CRT es incrementada por una señal generada por luz; el fotorreceptor primario involucrado en esta señalización por luz fue identificado como fitocromo B.

Algunos de los genes inducibles por sequía y/o frío son también inducidos por un tratamiento exógeno de ABA. Estos genes contienen elementos potenciales de respuesta a ABA (**ABA-responsive elements, ABRE**) en las regiones promotoras que son importantes para la transcripción. El elemento ABRE es definido como una secuencia de 8–10 pares de bases con la secuencia central **ACGT**. La secuencia que flanquea el núcleo ACGT es importante para la función *in vivo* y para unión de proteínas *in vitro*. La secuencia (C/T) ACGTGGC es un ABRE fuerte (Busk *et al.*, 1997; Izawa *et al.*, 1993). La mayoría de las proteínas que se unen a secuencias de DNA con el motivo central ACGT contienen una región básica adyacente a un motivo llamado cremallera de leucina y se conocen como factores de transcripción bZIP. La secuencia central ACGT es encontrada en algunos promotores y media la inducción por luz (Guiliano *et al.*, 1988), anaerobiosis (McKendree y Ferl, 1992), luz UV (Weisshaar *et al.*, 1991) y ácido cumárico (Loake *et al.*, 1992). Además, hay secuencias que contienen el núcleo ACGT que no funcionan como ABREs aún en promotores inducibles por ABA (Busk *et al.*, 1997). El promotor de *rd29A* contiene no solo el elemento DRE, sino también un ABRE, por lo que este gen está controlado por tres sistemas regulatorios independientes (**Fig.4**) (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994).

Hobo y cols. (1999) identificaron elementos *cis* llamados “coupling elements” (CE), los cuales son activos en combinación con un ABRE, pero no solos. La disección de los promotores de los genes de cebada *HVA22* y *HVA1* definió el complejo mínimo que responde a ABA (ABRC), que consiste en un “coupling element” y un ABRE capaz de conferir la transcripción inducible por ABA bajo un promotor mínimo. Los CE encontrados hasta ahora tienen un alto contenido de citosinas y guaninas (Shen *et al.*, 1996). Algunos factores de transcripción que se unen a un ABRE son: AREB1/ABF2, AREB2/ABF4, AREB3, ABF1 y ABF3 (Uno *et al.*, 2000; Choi, *et al.*, 2000).

También existen factores de transcripción inducidos por estrés cuyas secuencias de reconocimiento están involucradas en la transcripción inducida por ABA, como los factores Myc y Myb; estos factores pueden regular genes cuya inducción por ABA depende de la síntesis de proteínas, mientras que la regulación vía ABRE no la requiere (Iwasaki *et al.*, 1995;



## I.6 Proteínas LEA

Algunos de los genes mejor caracterizados cuya expresión es inducida en órganos vegetativos durante déficit hídrico, son los que codifican para las llamadas proteínas **LEA** (late embryogenesis abundant, proteínas abundantes de la embriogénesis tardía), que fueron descritas primeramente en semillas de algodón. Las LEA se han agrupado en varias familias de proteínas, las cuales se acumulan en altos niveles durante la etapa madura de la embriogénesis, justo antes del inicio de la desecación de la semilla (Battaglia y cols., 2008; Bies-Etheve y cols., 2008; Hundertmark y Hinch, 2008; Shih y cols., 2008; Tunnacliffe y Wise, 2007). Algunas proteínas LEA también se acumulan en tejidos vegetativos en respuesta a estrés osmótico, provocado por diversos factores ambientales (Bray, 1993; Galau *et al.*, 1986). En la mayoría de los casos reportados, su expresión está correlacionada con el aumento en los niveles de ABA, una fitohormona cuyo nivel endógeno aumenta no solo durante la embriogénesis tardía, promoviendo la tolerancia de embriones a la desecación, sino también durante el crecimiento vegetativo bajo condiciones de déficit hídrico (Busk y Pagès, 1998; Leung y Giraudat, 1998). ABA es capaz de inducir precozmente la expresión de dichos genes en embriones inmaduros o en tejidos vegetativos no estresados cuando se aplica exógenamente (revisado en Dure III, 1993).

En general, las proteínas LEA son altamente hidrofílicas, con un alto contenido de aminoácidos cargados y de glicinas, no poseen una estructura globular por lo que son resistentes a la coagulación por efecto de altas temperaturas y carecen o presentan porcentajes muy bajos de cisteínas y triptofanos; se ha propuesto que están localizadas en el citoplasma (revisado en Dure, 1993). Estas proteínas podrían tener propiedades que les permiten unirse con moléculas de agua y secuestrar iones, lo cual favorece la creación de un ambiente propicio para que interactúen con enzimas y otros constituyentes celulares de tal forma que no pierdan sus funciones y sean preservadas durante la sequía. Algunos estudios muestran una correlación entre los niveles de algunas proteínas tipo LEA y el grado de tolerancia a sequía (Cellier *et al.*, 1998).

La mayoría de las proteínas LEA se encuentran en un grupo más general denominado “hidrofilinas”, debido a que poseen un alto contenido de glicina (> 6%) y un alto índice de hidrofiliidad (> 1.0); se ha propuesto que algunas proteínas del tipo “hidrofilinas” podrían

haber sido seleccionadas como parte de un mecanismo adaptativo que ayuda a mantener una maquinaria traduccional funcional en un medio limitado de agua (Garay-Arroyo *et al.*, 2000).

### **I.6.1 Grupos de proteínas LEA**

Las proteínas LEA se agrupan en varias familias de acuerdo a la homología en sus secuencias de aminoácidos (Battaglia y cols., 2008; Bies-Ethève y cols., 2008; Hundertmark y Hincha, 2008; Shih y cols., 2008; Tunnacliffe y Wise, 2007):

**Grupo 1 (D-19):** son proteínas de bajo peso molecular (90–110 aminoácidos) altamente homólogas (65% de identidad y 80% de similitud entre mono y dicotiledóneas). Son muy ricas en glicina (16-21%) y se encuentran dispersas a lo largo de toda la proteína, lo que les confiere gran flexibilidad y favorece que no adopten estructuras secundarias (revisado en Dure III, 1993). Poseen un motivo interno hidrofílico formado por 20 aminoácidos: **GGQTRKEQLGEEGYREMGHK**, que ha sido encontrado en genes de cebada y algodón y puede estar repetido hasta cuatro veces (Espelund *et al.*, 1992; Galau *et al.*, 1992). Se ha sugerido que las proteínas del grupo 1 son altamente hidratables, creando un medio acuoso protector, como en el caso de la proteína Em de trigo (McCubbin y Kay, 1985; Espelund *et al.*, 1992).

**Grupo 2 o dehidrinas (D-11):** son muy hidrofílicas, de tamaño variable (14–150 kDa) y poseen diversos motivos característicos representados diferencialmente entre las distintas proteínas de la familia: pueden tener un segmento de 15 aminoácidos ricos en lisina al cual se le ha llamado el **segmento K**, con la secuencia consenso **EKKGIMDKIKELPG** y puede estar repetida varias veces. Algunas proteínas LEA del grupo 2 pueden poseer un segmento de 6-9 serinas fosforilables (**segmento S**), adyacente al K y también puede tener una secuencia característica en el N-terminal llamada el **segmento Y (DEYGNP)**. Goday y colaboradores (1994) demostraron que la región de serinas fosforilables se trata de un motivo presente en proteínas que se unen a otras proteínas para acarrearlas al núcleo y dicho motivo es el que reconoce la señal de localización nuclear. A las proteínas de este grupo se les ha asignado algunas posibles funciones, como el de estabilización de proteínas citoplásmicas contra desnaturalización (chaperoneo), unión a iones (particularmente sulfato y fosfato) y el de preservación de estructuras supermoleculares o membranas (Dure, 1993b; Close *et al.*, 1993a,

1993b; Kaye y Guy, 1995; Close, 1997). Recientemente, Heyen y colaboradores (2002) encontraron una proteína en la membrana de la vacuola de plantas de apio (*Apium graveolens*), VCaB45, que se une a calcio y esta propiedad es regulada por fosforilación. Otra función propuesta para proteínas de este grupo es la de transporte de metales a tejidos en crecimiento para prevenir el daño celular, como la proteína de transporte de  $Fe^{+3}$  (ITP), encontrada en el floema de plantas de higuera (*Ricinus communis* L., Krüger *et al.*, 2002).

Se han encontrado miembros de este grupo en plantas monocotiledóneas, dicotiledóneas y en la cianobacteria *Anabaena* sp. (Close y Lammers, 1993). Los mRNA de estas proteínas se acumulan en respuesta a estrés hídrico, iónico y por bajas temperaturas y son inducidos por la aplicación de ABA exógeno. Su abundancia es de aproximadamente el 0.5% de la proteína total soluble de un embrión y existe evidencia que sugiere que estos genes codifican proteínas que se unen a lípidos (Ismail *et al.*, 1999). Estas proteínas también son llamadas dehidrinas (dhn) y rab (por respuesta a ABA) en la literatura. Por ejemplo, la dehidrina ácida de trigo, WCOR40, se acumula en altos niveles en las regiones próximas de la membrana plasmática de células en el área de transición vascular y podría tener un posible papel de crioprotección de la membrana plasmática durante deshidratación inducida por congelamiento (Danyluk *et al.*, 1998).

**Grupo 3 (D-7):** se caracterizan principalmente por la presencia de un 11-ámero (TAQAAKEKAGE) conservado que puede estar repetido varias veces en tándem a lo largo de la proteína (entre 5 y 13), lo que hace que los miembros de esta familia sean de tamaños muy diferentes. Estos dominios se estructuran como  $\alpha$ -hélices anfipáticas, teniendo una superficie hidrofóbica formada por grupos metilo, como en el caso de las dehidrinas, que puede ser importante para la formación de un homodímero y otra superficie cargada que puede estar involucrada en el secuestro de iones (revisado en Dure III, 1993a). Estas proteínas se encuentran en una concentración citosólica de 0.226 mM en todo tipo de células embrionarias. Se predice que pueden tener un papel en el secuestro de iones que son concentrados durante la deshidratación celular. También se ha encontrado que una proteína LEA del grupo 3 de polen de *Typha latifolia* estabiliza cristales de glucosa *in vitro*, formando bio-cristales estables en el citoplasma que podrían atrapar moléculas biológicas frágiles en tiempo y espacio y preservarlas del daño por desecación (Wolkers *et al.*, 2001). De manera interesante, recientemente se ha identificado un gen tipo LEA 3 en el nemátodo anhidrobiótico

*Aphelenchus avenae* (la anhidrobiosis es un estado de latencia que presentan algunos organismos cuando están sujetos a condiciones de sequía; Browne *et al.*, 2002).

**Grupo 4 (D-113):** tienen un rango variable de tamaño (88–175 aminoácidos), son ricas en glicinas, treoninas y alaninas (11–20%); estas proteínas tienen una secuencia característica conservada de 60-80 aminoácidos, con una estructura prácticamente ininterrumpida de  $\alpha$ -hélice en el N-terminal. El resto de la proteína es una región de estructura aleatoria, está poco conservada y varía mucho en tamaño entre los diferentes miembros de la familia. En embriones de algodón esta proteína se encontró en una concentración de 0.3 mM en todo tipo de células (revisado en Dure III, 1993); se cree que estas proteínas pueden sustituir el agua para preservar estructuras membranales.

**Grupo 5 o LEAs atípicas:** al igual que las proteínas LEA, se ha encontrado que estas proteínas se expresan en hojas de plantas sometidas a estrés hídrico y en hojas desprendidas, pero se les llama atípicas porque no pertenecen a ninguna de las familias descritas y no presentan el grado de hidrofiliidad ni la composición general de aminoácidos que caracteriza a las LEAs (Galau *et al.*, 1993). Por ejemplo, la proteína LEA5 de algodón posee dominios hidrofóbicos en la región N-terminal que podría ser una señal de tránsito al retículo endoplásmico (Jackson *et al.*, 1997) y el resto de la proteína es hidrofílica; no es rica en glicinas pero sí en serinas, aproximadamente 15%. La proteína LEA14 de algodón en general es moderadamente hidrofóbica y tampoco es rica en glicinas (Galau *et al.*, 1993). Existen genes homólogos a *LEA5* inducidos por auxina (Yamamoto, 1994), por ácido giberélico en hojas, por choque térmico, por metales pesados y por tuberización, también en hojas (Jackson *et al.*, 1997). La LEA14 es casi idéntica a la proteína Lemmi9, que se induce en las agallas generadas por la infección de nemátodos en raíces de tomate y no por sequía (Van der Eycken *et al.*, 1996).

## **I.6.2 El grupo 6. La proteína LEA18**

En trabajos previos (Colmenero-Flores *et al.*, 1997) se encontró y caracterizó una proteína de frijol que presenta características similares a las de otras proteínas LEA, a la que se nombró como PvLEA18; esta proteína de 14 kDa es altamente hidrofílica y presenta una estructura en su mayoría como “random coil”. El transcrito y la proteína PvLEA18 se

acumulan en semilla seca, en tejidos vegetativos sometidos a estrés hídrico y a la aplicación de ABA.

Además, se ha encontrado que la proteína PvLEA18 no solo se acumula en tejido vegetativo expuesto a sequía sino también bajo condiciones favorables de irrigación, particularmente en la región de elongación del hipocotilo, en donde los potenciales hídrico y osmótico son más negativos; este fenómeno no había sido descrito anteriormente para ninguna proteína LEA conocida. En base a experimentos de localización inmunohistoquímica se ha demostrado que la proteína PvLEA18 está presente en el núcleo y el citoplasma de todo tipo de células, con una mayor acumulación en la epidermis y en los tejidos del cilindro vascular, particularmente en células de protoxilema y tejidos meristemáticos de raíces, aunque la mayor acumulación se ha detectado bajo condiciones de estrés hídrico. Por estas razones se ha clasificado a la PvLEA18 dentro de una nueva familia de LEAs, el grupo 6 (Colmenero-Flores *et al.*, 1999).

En otros experimentos se hicieron fusiones de las regiones no traducidas del gen *PvLEA18* al gen reportero *GUS* y como control se utilizó la construcción *5' PvLEA18::GUS::3' nos (nopalina sintasa)*. Estas construcciones fueron expresadas en plantas de *A. thaliana*, donde se analizó la actividad del gen reportero durante el desarrollo y en respuesta a déficit hídrico o ABA. Los resultados mostraron que los patrones de expresión del gen en las plantas transgénicas, sometidas a estrés hídrico o bien en condiciones de buena irrigación o por tratamiento con ABA, son semejantes a los observados en plántulas de fríjol. Además, la región 3' del gen *PvLEA18* aumenta la expresión del gen durante el desarrollo y deshidratación pero no en respuesta a ABA, y este efecto se da principalmente a través de una vía independiente de ABA; también la región promotora de 2058 pb, usada en las plantas transgénicas de *A. thaliana*, permite la expresión del gen durante desarrollo, en respuesta a deshidratación y en respuesta a ABA (Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001).

Además de que Colmenero-Flores y cols. (1999) han detectado la proteína PvLEA18 en el núcleo y el citoplasma de células de fríjol mediante experimentos de localización inmunohistoquímica, Quiroz-Castañeda (2005) ha encontrado que plantas transgénicas de *A. thaliana* expresando la proteína PvLEA18 fusionada con GFP-GUS acumulan la fusión en el citoplasma y no se transporta al núcleo, concluyendo que la PvLEA18 carece de señales funcionales tipo NLS que transloquen la proteína al núcleo.

### I.6.3 Posibles funciones de las proteínas LEA

Se ha sugerido que las proteínas tipo LEA actúan como moléculas que captan agua, en el secuestro de iones y en la estabilización de macromoléculas y membranas (Dure, 1993a, 1993b; Close, 1996; Ingram y Bartels, 1996; Thomashow, 1998, 1999). Se demostró que COR85, una proteína LEA del grupo dos, está involucrada en crioprotección de enzimas sensibles a congelamiento (Kazuoka y Oeda, 1994) y COR15am, el polipéptido maduro de COR15a, actúa directamente como una proteína crioprotectora al inhibir la formación de lípidos de fase hexagonal II, el tipo principal de lesión membranal inducida por congelamiento en plantas no aclimatadas (Steponkus *et al.*, 1998). La sobreexpresión de COR15a, el cual fue dirigido a los cloroplastos, aumentó la tolerancia a congelamiento de cloroplastos *in vivo* y de protoplastos *in vitro*. Este aumento muy probablemente fue el resultado del efecto estabilizante de la membrana de COR15a (Artus *et al.*, 1996; Steponkus *et al.*, 1998). Sin embargo, el efecto protector fue insignificante para la supervivencia de plantas completas durante congelamiento (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que dos proteínas LEA tienen un papel funcional en tolerancia a estrés. HVA1, una proteína LEA del grupo tres de cebada se introdujo en células en suspensión de arroz. Bajo condiciones de estrés, las plantas de arroz transgénico crecen mejor que las plantas no transformadas y también mostraron un desarrollo retardado de síntomas de daño causado por estrés y se recuperaron mejor después de remover las condiciones de estrés (Xu *et al.*, 1996). Sobre todo, la expresión constitutiva de la misma proteína en plantas transgénicas de trigo mejoró la productividad de la biomasa y la eficiencia del uso del agua bajo condiciones de estrés (Sivamani *et al.*, 2000). También la proteína LE25 de tomate, del grupo cuatro, ha sido sobreexpresada en *Saccharomyces cerevisiae* y se encontró que confiere una mejor resistencia a alta salinidad y congelamiento (Imai *et al.*, 1996).

Ndong *et al.* (2002) reportaron que la expresión constitutiva de una proteína tipo LEA cloroplástica de trigo, WCS19, en *Arabidopsis* dio como resultado un aumento significativo en la tolerancia a congelamiento.

La multiexpresión de proteínas tipo LEA activadas por factores de transcripción comunes correlaciona con la tolerancia a estrés por sequía, sal y congelamiento en plantas

transgénicas de *A. thaliana*, como es el caso en la sobreexpresión de DREB1A y CBF1 (Kasuga et al., 1999; Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998; Jaglo-Ottosen *et al.*, 2001).

## **HIPÓTESIS**

Las proteínas similares a PvLEA18 en *A. thaliana* (AtLEA18) participan en la respuesta adaptativa a déficit hídrico.

## **OBJETIVOS**

1. Determinar el número de miembros que componen la familia de genes tipo *LEA18* en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.
2. Analizar la expresión de *AtLEA18* en semilla y en tejido vegetativo, expuesto tanto a sequía como a la fitohormona ABA (ácido abscísico) y en tejido vegetativo bajo condiciones normales de irrigación.
3. Realizar un análisis funcional para determinar la contribución de la proteína AtLEA18 en la tolerancia a sequía, por medio de la generación de plantas transgénicas que la sobreexpresen.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1 Material vegetal

Se usaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia crecidas a 24°C, con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad durante cuatro semanas en Metro-Mix 200 estéril; las plantas se regaron una vez por semana con solución nutritiva Somerville [KNO<sub>3</sub> 5mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.5mM pH 5.6, MgSO<sub>4</sub> 2mM, Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 2mM, Fe-EDTA 0.05mM, micronutrientes; Somerville, 1982].

### II.2 Esterilización de semillas de *A. thaliana*

Las semillas de *A. thaliana* se hidrataron en tubos eppendorf con 600 µl de agua estéril durante toda la noche a 4°C. Los tubos con las semillas se centrifugaron por 20 s para quitar el agua y enseguida se trataron con 200 µl de etanol por 1 min. Se centrifugaron los tubos por 20 s y se descartó el etanol. A cada tubo se le añadieron 200 µl de una solución comercial de hipoclorito de sodio al 40% (CLORALEX™) y tritón 0.02%, las semillas se agitaron durante 5-10 min y se centrifugaron por 20 s para quitar la solución. Las semillas se lavaron siete veces con 600 µl de agua estéril y con el agua del último lavado se guardaron a 4°C, durante toda la noche, antes de sembrarlas (la cantidad de semillas utilizadas dependió del tipo de experimento a realizar).

### II.3 Tratamiento de estrés hídrico y aplicación de ABA

Se sembraron semillas de *A. thaliana* en cajas con medio de germinación GM (Valvekens *et al.*, 1988) y después de tres semanas se transfirieron las plántulas a una cámara húmeda para someterlas a estrés hídrico durante 3 ½, 7, 19 ó 24 horas; para cada una de estas condiciones de estrés se usaron seis plántulas. Se tomó el peso de todas las plántulas al inicio y al final de cada tratamiento de estrés y aproximadamente perdieron el 30% de su peso. Después del tratamiento de estrés hídrico, las plántulas se congelaron a -70°C.

En el caso de los tratamientos con la fitohormona ABA, se usaron cajas con medio de

germinación previamente machacado para que absorbiera uniformemente 1 ml de una solución de ABA 100  $\mu$ M y posteriormente se introdujeron en cada caja seis plántulas de tres semanas crecidas en caja con medio de germinación. Las cajas con las plántulas se mantuvieron en el cuarto de crecimiento durante 3 ½, 7, 19 ó 24 horas, al cabo de este tiempo se colectaron y se congelaron en nitrógeno líquido. Para el control se colectaron las plántulas crecidas en caja no tratadas e inmediatamente se congelaron (Jacobsen y Close, 1991; Iwasaki *et al.*, 1995).

#### II.4 Análisis de bases de datos

Para determinar el número de miembros de la familia de genes tipo *AtLEA18* y encontrar genes similares a *PvLEA18* en otras plantas, se llevó a cabo una búsqueda en los bancos de secuencias y de ESTs (expressed sequence tag) en la base de datos del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), de The Institute for Genomic Research (TIGR; <http://www.tigr.org>) y de Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS; <http://www.mips.gsf.de>), por medio del programa BLAST. Para esto, se usaron las secuencias nucleotídica y de aminoácidos del gen *PvLEA18* de frijol (U72764; Colmenero-Flores *et al.*, 1999).

#### II.5 Aislamiento y clonación de los genes *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2*

A partir de la secuencia nucleotídica que codifica para las proteínas *AtLEA18-1* (**At2g23110**) y *AtLEA18-2* (**At2g23120**) se diseñaron oligos específicos para cada gen, donde el oligo sentido contiene el codón de inicio de la traducción y el antisentido el codón de término de la traducción (indicados en negritas en la **Tabla 1**); en ambos genes, en el extremo 5' del oligo sentido se incluyó un sitio de restricción *Nco I* y en los oligos antisentido, un sitio *Sal I*. La región codificante de los genes *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2* se amplificó con la DNA polimerasa Vent (BioLabs™) por la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) utilizando el sistema DNA Thermal Cycler, Perkin Elmer Cetus™, usando como templado un banco de cDNA de Lacroute (construido a partir de mRNAs aislados de plántulas completas, incluyendo la raíz, en la etapa de dos hojas de *A. thaliana* ecotipo *Landsberg erecta*, crecidas en condiciones normales; Minet *et al.*, 1992).

Los productos de PCR obtenidos se clonaron en el sitio *Eco* RV del vector pKS<sup>+</sup>, perdiéndose el sitio de restricción para *Eco* RV; este vector posee un gen de resistencia a ampicilina para ser usado como marcador de selección.

GEN	OLIGOS
<i>AtLEA18-1</i>	AAA <u>CCATGG</u> AGG ATC AGA AAA AG (K, sentido) <i>Nco I</i> GCG <u>GTCGAC</u> TCA CGG AAC GCC CTG ACG (J, antisentido) <i>Sal I</i>
<i>AtLEA18-2</i>	AAA <u>CCATGG</u> AGG CCG GGA AAA CA (WA, sentido) <i>Nco I</i> GCC <u>GTCGAC</u> TCA CGG AGC TTT CGC ATC (WB, antisentido) <i>Sal I</i>
<i>AtLEA18-3</i>	GCG <u>CCATGG</u> CGA AGA GTG AAG AG (AP, sentido) <i>Nco I</i> AAA <u>GTCGAC</u> GTG GTT CAC TTC TTA GCT (PL, antisentido) <i>Sal I</i>

**Tabla 1. Oligos diseñados para la amplificación de los cDNAs de los genes *AtLEA18-1* y *2* y los propuestos para el aislamiento del gen *AtLEA18-3*.**

## II.6 Secuenciación

A partir de células de *E.coli* se aisló el plásmido que contenía la construcción con el gen *AtLEA18-1* o *AtLEA18-2* por el método de lisis alcalina (Birnboim, 1979; Ish-Horowicz, 1981); el DNA obtenido se purificó en columnas de QIAGEN (QIAGEN<sup>™</sup> Plasmid Mini Kit). El DNA clonado se secuenció por el método basado en fluorescencia de la terminación del ciclo de secuencia por coloración Taq FS en la **Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología** de la UNAM, usando los oligos ks y sk del plásmido pKS<sup>+</sup>. La identidad de las secuencias se verificó con el programa GAP y BESTFIT del paquete GCG (Seqweb, Wisconsin Package).

## **II.7 Marcaje de sondas**

Para los experimentos tipo Southern y Northern se usaron como sondas las regiones codificantes de los genes *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2*. Las sondas fueron marcadas por el método de Feinberg y Vogelstein (1983) usando ( $\alpha$ - $^{32}$ P)dCTP. Para la detección del gen *rd29A* se usó como sonda la región 3' no traducida obtenida por PCR, donada amablemente por la Dra. Ana Lilia Arroyo.

## **II.8 Análisis tipo “Southern” de los genes *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2***

Se analizaron 2  $\mu$ g de cada uno de los genes en geles de agarosa al 2% y posteriormente se transfirieron a una membrana de nylon (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham™) en condiciones semi-secas (Kempter *et al.*, 1991). La hibridación se llevó a cabo en buffer PSE (Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.3 M pH 7.2, SDS 7%, EDTA 1 mM) y los lavados se hicieron en condiciones estrictas (68°C, SDS [dodecil sulfato de sodio] 0.1%-SSC [citrate de sodio salino] 0.1x; Church y Gilbert, 1984). Las membranas marcadas se expusieron junto con una película Kodak™ XAR a -80°C y posteriormente la película se reveló.

## **II.9 Aislamiento de RNA total y análisis tipo Northern**

Para el aislamiento de RNA total de semillas y de tejido foliar de las plantas transgénicas T<sub>1</sub> y de las plántulas completas de tres semanas sometidas a estrés hídrico y tratamiento con la solución de ABA 100  $\mu$ M durante 3 ½, 7, 19 y 24 horas se utilizó el método del TRIZOL (Chomczynski, 1987), siguiendo las instrucciones del fabricante (GIBCO BRL™). El RNA se resuspendió en H<sub>2</sub>O libre de RNAsas y la concentración se determinó por absorbancia a 260 nm (1 D.O.=50  $\mu$ g de RNA).

Para los ensayos tipo Northern se usaron geles de agarosa al 1% con formaldehído al 2.2% en los que se separaron 10  $\mu$ g de RNA total, de acuerdo al método de Sambrook y colaboradores (1989). El RNA se transfirió a una membrana de nylon (Hybond-N<sup>+</sup>, Amersham™) en condiciones semi-secas con SSC 10x; las condiciones de hibridación y el revelado se hicieron de la misma forma que en los análisis tipo Southern.

## II.10 Clonación del gen *AtLEA18-1* en vectores de expresión de planta

Para sobreexpresar el gen *AtLEA18-1* se utilizaron los vectores binarios con una copia del promotor 35S (pBin35S) y con tres copias (pBin3x35S); ambos vectores poseen un marcador de resistencia a kanamicina tanto para bacteria como para planta. Dentro de estos vectores el gen *AtLEA18-1* se clonó bajo la regulación del promotor constitutivo fuerte del Virus del Mosaico de la coliflor 35S (en una o tres copias) y el terminador del gen *nos* (nopalina sintasa). El cDNA de *AtLEA18-1* se insertó en el sitio *BamH I*–*Kpn I* de estos vectores.

## II.11 Cruza triparental

Se hizo una crusa triparental usando la cepa C58C1 de *A. tumefaciens* (con el gen de resistencia a rifampicina), la cepa del “helper” o ayudador que posee el plásmido pRK2013 (con el gen de resistencia a kanamicina) y las cepas de *E. coli* que contenían el plásmido binario con tres copias del promotor 35S y el gen *AtLEA18-1* o con el promotor 35S en una sola copia y el gen *AtLEA18-1*. Además se hicieron las cruzas con los controles respectivos, pBin35S y pBin3x35S.

Para hacer la crusa triparental, en una caja con medio Lb se colocaron 5 µl de un cultivo de la cepa de *E. coli* con una de las construcciones y 5 µl del cultivo del ayudador, se incubó por 2 horas a 37°C. Sobre el halo de crecimiento se añadieron 5 µl del cultivo de *A. tumefaciens* y se incubó por 2 horas a 28°C. Con una asa se raspó todo el halo y se inoculó 1 ml de medio Lb, con este medio se estrió una caja de medio Lb-rifampicina-kanamicina (los antibióticos se usaron a una concentración de 100 mg/ml, de rifampicina y 50 mg/ml, de kanamicina) por tratamiento y se incubó por 2 días a 28°C. Las clonas positivas, que poseían el gen de resistencia a kanamicina, se confirmaron por análisis de restricción.

## **II.12 Transformación de plantas de *A. thaliana* con *A. tumefaciens* por el método de infiltración**

Con una de las colonias positivas de *A. tumefaciens* de cada construcción, se inoculó 1 L de medio de cultivo Lb más los antibióticos kanamicina y rifampicina y se incubaron durante 16 horas a 28°C con agitación (250 rpm). Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica entre 1.2–2.0 (Spectrophotometer DU 640, Beckman™), se centrifugó a 10000 rpm (rotor JA-14, Beckman™) a temperatura ambiente durante 15 min, para bajar las células. La pastilla se resuspendió con 5 ml de medio de infiltración estéril (sales MS 2.2 g/L, vitamina B5 1ml/L, sacarosa 50 g/L, MES 0.5 g/L; pH=5.7) a temperatura ambiente y la suspensión de células se mezcló con 1.2 L de medio de infiltración adicionando 0.044 µM de bencilaminopurina y 200 µl/L de silwet L-77, que disminuye la tensión superficial para que la planta absorba mejor el medio de infiltración. Este medio se vació en un recipiente de acrílico especialmente diseñado para transformación por infiltración con *A. tumefaciens* y se colocaron las macetas invertidas, de forma que las plantas se sumergieran en el medio de infiltración durante 15 minutos (Bechtold, 1993; Ye, 1999). Para la transformación se utilizaron cinco macetas con cinco plantas de cuatro semanas cada una, podándolas regularmente para originar más inflorescencias; las macetas se cubrieron con una malla para sostener el sustrato durante la infiltración (Clough y Bent, 1998).

Después de la infiltración las plantas se lavaron muy bien con agua estéril para quitar el exceso de medio y se colocaron en charolas con una cubierta de plástico; a partir del tercer día las macetas se destaparon poco a poco y se regaron todos los días.

## **II.13 Método de selección de plantas transgénicas**

Las semillas obtenidas de las plantas transformadas (semilla T<sub>0</sub>) se esterilizaron superficialmente (1250 semillas/tubo = ±50 µl) y se sembraron en cajas con medio de crecimiento (sales MS 4.3 g/L [Murashige y Skoog, 1962], vitamina B5 1ml/L, sacarosa 10 g/L, MES 0.5 g/L, fitoagar 8 g/L; pH=5.7). El medio se complementó con kanamicina (50 mg/ml), para seleccionar las plantas transgénicas y se añadió el antibiótico claforán (400 mg/ml), para evitar contaminación por *Agrobacterium tumefaciens*.

Para distribuir las semillas en la caja, se resuspendieron en 800  $\mu$ l de agarosa 0.1%-kanamicina-claforán estéril y esta suspensión se dispersó sobre la caja. Las cajas se sellaron con parafilm y para romper la dormancia se dejaron tres días a 4°C, después se pasaron al cuarto de cultivo en donde crecieron a 24°C, con un fotoperiodo de 16 horas luz/8 horas oscuridad. Después de dos semanas en el cuarto de cultivo las plantas seleccionadas por su resistencia a kanamicina, se trasplantaron a macetas con Metro-Mix 200 (Sun Gro™) cubriéndolas completamente con plástico y destapándose dos días después (poco a poco) para disminuir el efecto del cambio de las condiciones de crecimiento.

Las semillas de cada planta se cosecharon individualmente (semilla T<sub>1</sub>). De cada línea se tomaron 100 semillas, que se esterilizaron superficialmente y se sembraron semilla por semilla en dos cajas (50 semillas en cada una) con el medio de selección; de las plantas resistentes al antibiótico se tomaron 15 de cada línea y se trasplantaron a Metro-Mix 200 para obtener la semilla T<sub>2</sub>.

De las plantas que crecieron en las cajas con medio de selección se tomaron otras 10 que se trasplantaron a suelo, se crecieron y el tejido foliar se colectó en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C.

## **II.14 Generación del anticuerpo anti-AtLEA18-1**

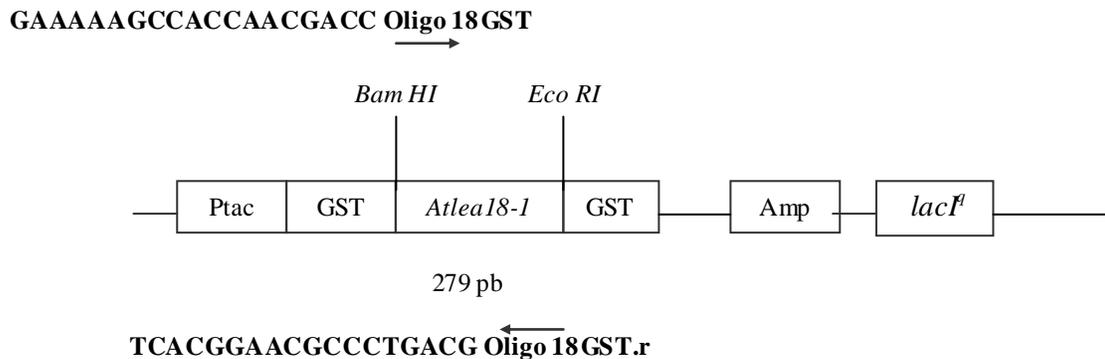
### **II.14.1 Construcción de la proteína de fusión GST - AtLEA18-1**

Para generar una proteína de fusión entre AtLEA18-1 y GST, se aisló por PCR el gen *AtLEA18-1* a partir de una librería genómica de *A. thaliana* (los genes *AtLEA18* carecen de intrones) utilizando los oligos específicos 18.GST (con un sitio *Bam HI*) y 18GST.r (con un sitio *Eco RI*), diseñados en base a la secuencia nucleotídica del gen (ver **Fig. 5**). El gen aislado se clonó en el vector pKS<sup>+</sup> en el sitio *Eco RV*, se seleccionó una clona positiva y se verificó por análisis de restricción. Posteriormente, el marco de lectura abierto del gen *AtLEA18-1* se subclonó en fase con el gen que codifica para la proteína GST (glutación-S-transferasa), en la región que codifica el C-terminal de la proteína, dentro del plásmido pGEX1 (en los sitios *Bam HI* y *Eco RI*; **Fig. 5**); como control se utilizó el plásmido que no expresa la proteína de fusión, solo GST. El vector pGEX1 posee un gen de resistencia a ampicilina y un promotor

Ptac, el cual es inducible por IPTG (isopropil-1-tio-β-D-galactósido).

Se transformaron células de *E. coli* con el plásmido pGEX1 que posee el gen *AtLEA18-1* y el plásmido sin el gen (pGEX1), se seleccionó una clona positiva para cada construcción y se verificaron por análisis de restricción.

De un cultivo crecido durante toda la noche de la cepa positiva, se tomó 1 ml de cada una para inocular 100 ml de Lb-ampicilina (para cada construcción) y se incubaron por 3 horas a 37°C con agitación (300 rpm). Se indujo la expresión de la proteína GST y de la proteína de fusión GST-*AtLEA18-1* con IPTG 1 M (1mM final), tomando 1 ml de cada cultivo de *E. coli* en los tiempos 0, 1 y 2 horas de inducción; después las células se lisaron con buffer Laemmli (Laemmli, 1970). Los extractos proteicos se analizaron en gels de SDS-PAGE al 15% teñidos con Coomassie Blue R-250 para detectar la producción de las proteínas GST y GST-*AtLEA18-1*.



**Figura 5. Estrategia de clonación del gen *AtLEA18-1* dentro del plásmido pGEX1.**

#### II.14.2 Purificación de la proteína de fusión

Una vez confirmada la expresión de la proteína de fusión, se obtuvo una mayor cantidad de la proteína de fusión a partir de 400 ml de cultivo, la cual se purificó por afinidad con perlas de glutatión-agarosa (Ausubel *et al.*, 1995). Para obtener la proteína de fusión GST-*AtLEA18-1* se inocularon 400 ml de medio Lb-ampicilina con 1 ml de un cultivo crecido durante toda la noche de la cepa positiva y se incubó por 3 horas a 37°C con agitación

(300 rpm); después de este tiempo se añadió 400 µl de IPTG 1 M (1 mM final) y se continuó con la incubación durante 2 horas. Después se colectaron las células centrifugando 10 min a 10000 rpm (rotor JA-14, Beckman) y se resuspendieron en 2 ml de PBS frío (NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). La suspensión de células se distribuyó en alícuotas de 1 ml en tubos eppendorf y se sonicó en intervalos de 30 s hasta lisar completamente las células. Al lisado se le añadió 10% Tritón X-100 (final), se mezcló y se centrifugó 5 min a 14000 rpm (en una centrífuga de mesa) a 4°C y al sobrenadante se le añadieron perlas de glutatión-agarosa. Las perlas se lavaron cuatro veces con PBS frío y en cada lavado se centrifugó 10 s a 14000 rpm a temperatura ambiente. Después del último lavado la proteína adherida a las perlas se desprendió mediante lavado con buffer laemmli, durante 5 min en ebullición.

### **II.14.3 Generación del anticuerpo anti-AtLEA18-1**

La fracción enriquecida GST-AtLEA18-1 se separó en geles de SDS-PAGE al 15% (para visualizar la proteína de fusión se tiñó el gel con azul de Coomasie) y se cortó la banda de 37.2 kDa, que corresponde con el peso esperado de la proteína de fusión. Esta banda se molió con nitrógeno líquido y se mezcló con un volumen igual de agua y adyuvante completo de Freund (GIBCO BRL™) hasta obtener una emulsión con la que se inyectó a un conejo por vía subcutánea. Se hicieron dos inmunizaciones cada tres semanas; al término de ellas el conejo se desangró para la obtención del suero inmune (Harlow, 1988).

### **II.15 Cuantificación y titulación de la proteína AtLEA18-1**

La proteína de fusión GST-AtLEA18-1 se cuantificó en un gel de SDS-PAGE al 15% usando diferentes volúmenes de proteína purificada (1, 3, 5 y 10 µl) y se compararon con cantidades conocidas de albúmina sérica bovina (BSA; 25, 50, 100, 200, 400 y 800 ng).

El anticuerpo se tituló contra diluciones de cantidades conocidas de su antígeno (1, 10, 20, 40 y 100 ng), mediante ensayos tipo Western utilizando el suero inmune en dilución 1:500. Como anticuerpo secundario se usó anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim™) en dilución 1:2000.

## II.16 Extracción de proteínas

Para la extracción de proteína total se usaron tres métodos diferentes:

1. Para la extracción de proteínas totales de *E. coli* y de tejido foliar de las plantas transgénicas T<sub>1</sub> de *A. thaliana*, se añadió un volumen igual de buffer Laemmli 2x, la suspensión se calentó a ebullición por 5 min y se centrifugó 5 min a 14000 rpm para colectar el sobrenadante (Laemmli, 1970).

2. Para hacer la extracción de proteínas totales de semilla, planta silvestre y de una de nuestras líneas transgénicas (2.11) de *A. thaliana* por el método de TCA-acetona, el tejido molido y congelado se mezcló con una solución de TCA 10% en acetona y se incubó a -20°C toda la noche. La muestra se centrifugó 10 min a 14000 g y la pastilla se lavó cinco veces con acetona fría. La pastilla se secó con vacío y se resuspendió en dos volúmenes de buffer Laemmli.

3. Para la extracción de proteínas totales de semilla, planta silvestre y de la línea transgénica 2.11 se utilizó el reactivo TRIZOL, siguiendo las instrucciones del fabricante (GIBCO BRL).

Todos los extractos se analizaron por electroforesis en geles de SDS-PAGE al 15% y mediante tinción con una solución de Coomassie Blue R-250.

## II.17 Ensayos tipo Western

Después de la electroforesis en un gel de SDS-PAGE al 15%, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C extra, Amersham™) en condiciones semi-secas durante 1 hora a 200 mAmp con buffer de transferencia (0.19 M glicina, 25mM Tris-HCl, 20% metanol [Towbin, 1979]). La transferencia se verificó por tinción reversible de las membranas, con reactivo de rojo de Ponceau S (0.2% de rojo de Ponceau disuelto en ácido acético al 1%).

Posteriormente, las membranas se bloquearon en TBS-leche 5% (TBS: 20mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl; leche descremada en polvo) por 2 horas a temperatura ambiente, con agitación oscilatoria. Ya bloqueadas las membranas, una de ellas se incubó toda la noche a 4°C con el suero inmune y otra con el suero preinmune. Ambos sueros se usaron en una

dilución 1:500. Al día siguiente las membranas se lavaron con TBS-leche 5% tres veces por 10 min para quitar el exceso de anticuerpo, se incubaron dos horas con el anticuerpo secundario, acoplado a fosfatasa alcalina en dilución 1:2000 (Boehringer Mannheim™), con agitación oscilatoria y a temperatura ambiente. Al término de la incubación con el anticuerpo secundario, las membranas se lavaron tres veces con TBS durante 10 min.

Para revelar se incubaron las membranas con el sustrato de la fosfatasa alcalina BCIP/NBT (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato/cloruro de tetrazolio nitroazul) disueltos en el buffer de fosfatasa (Tris-HCl 0.1 M pH 9.0, MgCl<sub>2</sub> 5mM, NaCl 0.1 M) hasta la aparición de las bandas. La reacción se detuvo lavando con agua destilada.

## **II.18 Inmunopurificación del anticuerpo**

Se inmunopurificó el anticuerpo anti-PvLEA18 por el método de precipitación con sulfato de amonio (Harlow and Lane, 1988b); para esto, en un gel de SDS-PAGE al 12% se aplicaron 50 µg de antígeno y se transfirieron a nitrocelulosa. La membrana se tiñó reversiblemente con rojo de Ponceau S para detectar la banda del antígeno y recortarla. La tira de nitrocelulosa se bloqueó con 2 ml de TBS-leche 5% por una hora a temperatura ambiente con agitación oscilatoria.

Previamente, se enriqueció la fracción de IgG's del suero inmune (200 µl) por precipitación con 0.2 ml de sulfato de amonio saturado durante media hora. Al término de la precipitación, se centrifugó 10 min a 14000 rpm y las IgG's se resuspendieron en 2 ml de TBS. La tira de nitrocelulosa que contenía el antígeno se incubó con la fracción de IgG's, toda la noche a 4°C con agitación oscilatoria. Al día siguiente la membrana se lavó durante 5 min 5 veces, con 5 ml de TBS y se eluyó el anticuerpo con 0.5 ml de glicina 0.2 M pH 2.7 durante 15 min. El eluido se neutralizó con 25 µl de Tris 2 M y el anticuerpo inmunopurificado se almacenó a 4°C con azida de sodio 0.02%. La membrana se enjuagó, se bloqueó con 5 ml de TBS-leche 5% durante 1 hora y se guardó a -20°C para una posterior reutilización.

### III. RESULTADOS

#### III.1 Identificación de proteínas similares a PvLEA18 en *Arabidopsis thaliana*

Colmenero-Flores y colaboradores (1997) identificaron un cDNA de frijol que codifica para una proteína de semilla, la PvLEA18, la cual es altamente hidrofílica, inducible por sequía y por la fitohormona ABA. En base a estos hallazgos, Colmenero-Flores y colaboradores (1997, 1999) propusieron que esta proteína podría pertenecer a una nueva familia de proteínas tipo LEA, el grupo 6. A finales del año 2000 la secuencia del genoma de la planta modelo *Arabidopsis thaliana* se completó, por lo que resultaba interesante llevar a cabo una búsqueda de genes similares a *PvLEA18* en *A. thaliana*; al hacer la búsqueda en la base de secuencias de *A. thaliana* (<http://www.arabidopsis.org/BLAST/>), encontramos que existe una pequeña familia de genes que codifican para proteínas semejantes a PvLEA18. Esta familia está formada por tres genes que se encuentran en el cromosoma II de *A. thaliana* y son: **At2g23110**, **At2g23120** y **At2g33690**, a los que hemos denominado *AtLEA18-1*, *AtLEA18-2* y *AtLEA18-3*, respectivamente. Los genes *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2* se localizan uno tras de otro, lo cual podría indicar que ha habido un fenómeno reciente de duplicación. El gen *AtLEA18-3* se encuentra en otra región dentro del cromosoma II.

Al analizar los niveles de identidad entre la región nucleotídica correspondiente a la parte codificante de los diferentes miembros de la familia génica *AtLEA18* y de su homólogo en frijol, *PvLEA18*, encontramos un porcentaje significativo de identidad (**Tabla 2**), que va del 51.4 a 56.9%; también observamos un porcentaje significativo de identidad entre las secuencias de la familia génica *AtLEA18*, del 47.2 al 62.9% (**Tabla 2**). Al llevar a cabo el mismo tipo de análisis pero a nivel de proteína, encontramos que el producto codificado por el gen *AtLEA18-2* es más similar a la proteína PvLEA18 (en un 53.4%) que las otras dos (48.8% *AtLEA18-1* y 47.9% *AtLEA18-3*); además, las proteínas *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2* son más homólogas entre sí que con *AtLEA18-3* (**Fig. 6, Tabla 3**).

```

PvLEA18      1 MEKEKK-----TESEIQGKVNLEGLPTEDSPYVKYKDLLEDYKQQGYGTQ
AtLEA18-1    1 MEDQKKPPTT---EQEVKEVKNDLESIKTPYLDYDNLEDYKMKGYGAQ
AtLEA18-2    1 MEAGKTPPTTTTTEKKTEQVKDNDLPT--DSPYMATGTLEDHKLKAYCAE
AtLEA18-3    1 -----MSKSEEQELPLETSPYTKYEDIEDYKKNAYGTS
Consenso     1 me  kkpptt  te etk vk  dLptedsPYvkyddLEDyKmkgyG q

PvLEA18      44 GHQEPKTGRGA--GATEAPTLSGA---AFSSKSQATGTG-ATNHK---
AtLEA18-1    47 GHQEPKLG MGG--GATDAPT PSGGLGRGGGAASTDLSSTDAINRQGV
AtLEA18-2    50 GHQEP T PGLGG--GSTDAPT PSGD---APAATTTDAKAP-----
AtLEA18-3    35 GHQDVKPGHGGFTGT TDAPT PSGD---AAPS A I D S A N Q K-----AKK
Consenso     51 GHQepkpG Gg  GaTdAPTpSGd  agg astda t  a nh g

```

**Figura 6. Alineamiento de las secuencias homólogas a la proteína PvLEA18 encontradas en *A. thaliana*.** Los aminoácidos en cuadros negros indican aminoácidos idénticos y los que están en cuadros grises, a los similares.

	<i>PvLEA18</i>	<i>AtLEA18-1</i>	<i>AtLEA18-2</i>	<i>AtLEA18-3</i>
<i>PvLEA18</i>	100	52.3	51.4	56.9
<i>AtLEA18-1</i>		100	62.9	47.2
<i>AtLEA18-2</i>			100	54.6
<i>AtLEA18-3</i>				100

**Tabla 2.** Comparación de los porcentajes de identidad entre las secuencias nucleotídicas de *AtLEA18* y *PvLEA18*, usando el programa GAP del paquete GCG.

	<i>PvLEA18</i>	<i>AtLEA18-1</i>	<i>AtLEA18-2</i>	<i>AtLEA18-3</i>
<i>PvLEA18</i>	100/100	52.4/48.8	56.2/53.4	54.9/47.9
<i>AtLEA18-1</i>		100/100	60.8/54.4	43.7/38
<i>AtLEA18-2</i>			100/100	58.8/52.9
<i>AtLEA18-3</i>				100/100

**Tabla 3.** Comparación de los porcentajes de similitud/identidad entre las secuencias de aminoácidos de *AtLEA18* y *PvLEA18*, usando el programa GAP del paquete GCG.

AMINOÁCIDO	PROTEINA			
	AtLEA18-1	AtLEA18-2	AtLEA18-3	PvLEA 18
Gly (G)	<b>14 (15.22%)</b>	<b>9 (10.84%)</b>	<b>7 (9.86%)</b>	<b>11 (12.79%)</b>
Ala (A)	6 (6.52%)	<b>10 (12.05%)</b>	<b>7 (9.86%)</b>	7 (8.14%)
Ser (S)	5 (5.43%)	3 (3.61%)	<b>7 (9.86%)</b>	6 (6.98%)
Thr (T)	7 (7.61%)	<b>17 (20.48%)</b>	6 (8.45%)	<b>9 (10.47%)</b>
Val (V)	3 (3.26%)	1 (1.20%)	1 (1.41%)	2 (2.33%)
Leu (L)	6 (6.52%)	4 (4.82%)	2 (2.82%)	4 (4.65%)
Ile (I)	2 (2.17%)	<u>0 (0.00%)</u>	2 (2.82%)	<u>0 (0.00%)</u>
Pro (P)	7 (7.61%)	<b>10 (12.05%)</b>	6 (8.45%)	4 (4.65%)
Cys (C)	<u>0 (0.00%)</u>	<u>0 (0.00%)</u>	<u>0 (0.00%)</u>	<u>0 (0.00%)</u>
Met (M)	3 (3.26%)	2 (2.41%)	1 (1.41%)	2 (2.33%)
His (H)	1 (1.09%)	1 (1.20%)	2 (2.82%)	2 (2.33%)
Tyr (Y)	4 (4.35%)	3 (3.61%)	4 (5.63%)	4 (4.65%)
Asp (D)	<b>9 (9.78%)</b>	7 (8.43%)	6 (8.45%)	3 (3.49%)
Glu (E)	7 (7.61%)	6 (7.23%)	6 (8.45%)	<b>9 (10.47%)</b>
Lys (K)	<b>8 (8.47%)</b>	7 (8.43%)	<b>9 (12.68%)</b>	<b>12 (13.95%)</b>
Arg (R)	2 (2.17%)	<u>0 (0.00%)</u>	<u>0 (0.00%)</u>	2 (2.33%)
Asn (N)	3 (3.26%)	1 (1.20%)	2 (2.82%)	2 (2.33%)
Gln (Q)	5 (5.43%)	2 (2.41%)	3 (4.23%)	6 (6.98%)
Phe (F)	<u>0 (0.00%)</u>	<u>0 (0.00%)</u>	<u>0 (0.00%)</u>	1 (1.16%)
Trp (W)	<u>0 (0.00%)</u>	<u>0 (0.00%)</u>	<u>0 (0.00%)</u>	<u>0 (0.00%)</u>
Ter	<u>0 (0.00%)</u>	<u>0 (0.00%)</u>	<u>0 (0.00%)</u>	<u>0 (0.00%)</u>

**Tabla 4.** Composición de aminoácidos en porcentaje en número de cada una de las proteínas AtLEA18 y de su homóloga PvLEA18. Los aminoácidos que están en letras negritas son los más abundantes y los subrayados no están presentes en la proteína.

Además de que la familia de proteínas AtLEA18 posee una homología significativa con la proteína PvLEA18, hay otras características que comparten, como son: 1) el tener un peso molecular pequeño, 2) alta hidrofiliidad, 3) alto porcentaje de glicinas y 4) carecer de cisteínas y triptofanos, al igual que la mayoría de las proteínas tipo LEA (**Fig. 6, Tablas 4 y 5**). Al analizar las secuencias nucleotídicas de los genes *AtLEA18*, encontramos que no poseen

intrones, al igual que el gen *PvLEA18*. También podemos observar que las proteínas tipo LEA18 además de ser ricas en glicina, lo son en lisina, alanina y treonina (**Tabla 4**), lo que les da la característica de una alta hidrofiliidad.

PROTEINA	No.de acceso	LONGITUD aa.	ORF pb	PM kDa	PI
AtLEA18-1	At2g23110	93	279	9.7	6.9
AtLEA18-2	At2g23120	84	252	8.5	6.6
AtLEA18-3	At2g33690	72	216	7.6	7.0
PvLEA18	U72764	82	258	9.3	6.4

**Tabla 5.** Características de las proteínas similares a PvLEA18 encontradas en *A. thaliana*.

### III.2 Identificación de elementos *cis* en los promotores de los genes de la familia *AtLEA18*

Se analizó la región promotora de cada uno de los miembros de la familia *AtLEA18*, para determinar la existencia de posibles elementos *cis*, los cuales podrían estar involucrados en la respuesta a estrés. Para ello, se analizaron aproximadamente 1200 pares de bases de la región intergénica del gen *AtLEA18-1*, 1200 pares de bases de *AtLEA18-2* y 407 para *AtLEA18-3*, a partir del nucleótido adjunto al codón de inicio de la traducción hacia atrás. En el caso de *AtLEA18-3* se analizaron solo 407 pb porque son los nucleótidos que hay entre el marco de lectura de este gen con el del anterior; también se analizó la región 3' no traducida de los tres genes, tomando 327 pares de bases después del codón de término de la traducción debido a que es el tamaño promedio de las regiones 3' no traducidas en plantas (Graber *et al.*, 1999). Los elementos *cis* encontrados en las posibles regiones promotoras y en la región 3'-UTR y su localización se describen en la **Tabla 6** y la posición de cada elemento en la secuencia nucleotídica se representa en la **Figura 7**.

Como podemos ver en la **Figura 7**, en el gen *AtLEA18-1* encontramos un sitio de reconocimiento por el factor de transcripción MYB (dependiente de la síntesis de proteínas), un motivo CE1 (couplig element), cuatro secuencias con un núcleo ACGT y dos cajas ABRE

(ABA-responsive element, elemento que responde a ABA). Además encontramos señales para la expresión genética en eucariotes, tales como el motivo TATA y cuatro posibles cajas CAAT, necesarias para un inicio de la transcripción eficiente. Al analizar la secuencia nucleotídica de la región 3' del gen, encontramos seis posibles señales de poliadenilación, además de dos motivos UE conservados requeridos para el procesamiento del 3' de mRNA vegetal (Graber *et al.*, 1999).

En el gen *AtLEA18-2* encontramos un sitio de reconocimiento MYB, un elemento DRE (DRE, drought-responsive element), una secuencia con un núcleo ACGT y dos cajas ABRE. Además encontramos el motivo TATA y cuatro posibles cajas CAAT. Al analizar la secuencia nucleotídica de la región 3' del gen, encontramos siete posibles señales de poliadenilación y dos motivos UE.

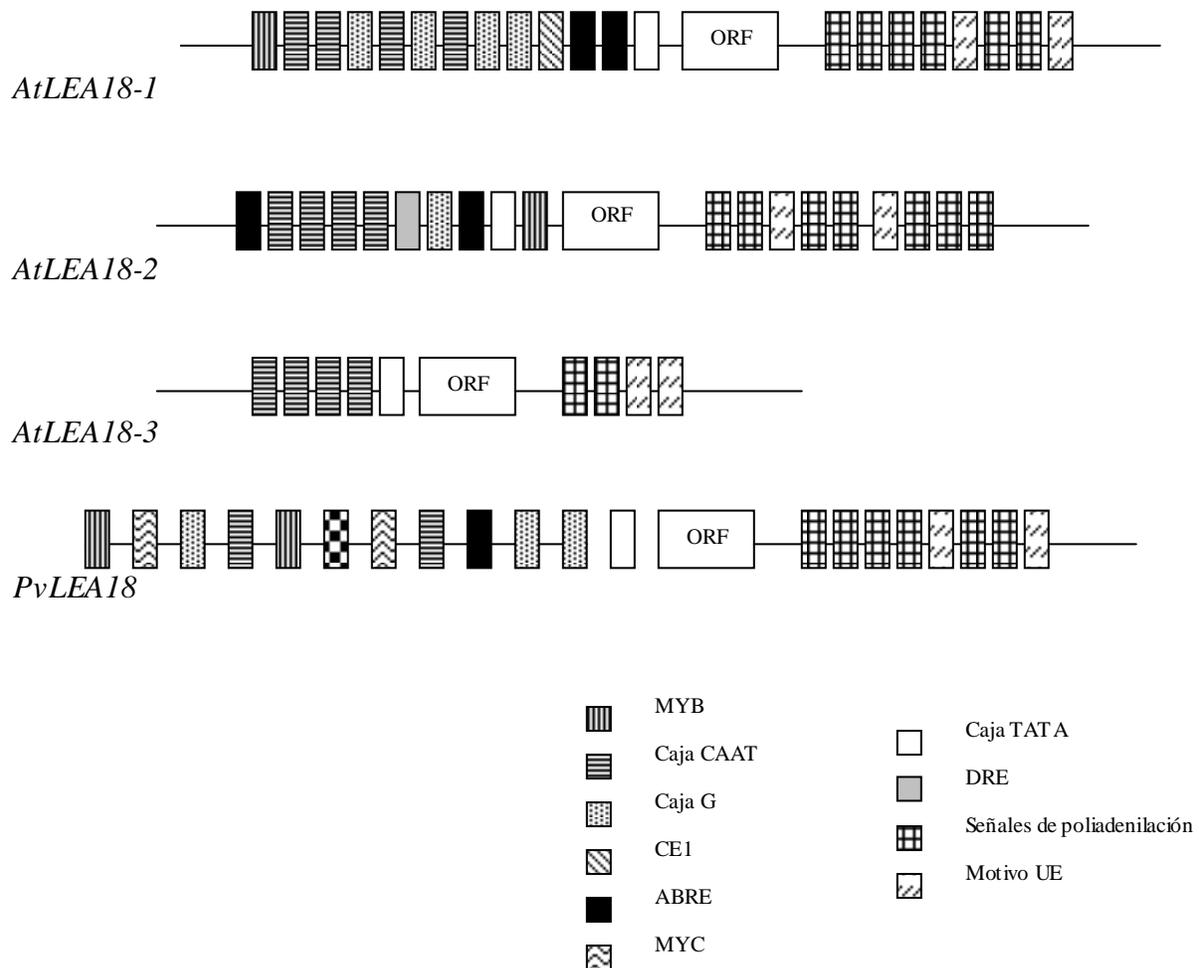
ELEMENTO CIS	<i>AtLEA18-1</i>	<i>AtLEA18-2</i>	<i>AtLEA18-3</i>
MYB (CAACTA)	-799	-22	
CAAT	-241, -394, -610, -724	-271, -463, -553, -1049	-96, -109, -119, -123
CAJA G (CACGTG)	-132, -155, -251, -550	-162	
CEI (TGCCACCGG)	-108		
ABRE (ACGTG)	-67, -91	-134, -1192	
TATA	-57	-51	-73
DRE (CCGAC)		-185	
<b>SEÑALES EN 3'</b>			
S. DE POLIADENILACIÓN	+332, +368, +375, +381, +432, +465	+255, +270, +327, +372, +442, +551, +557	+347, +425
S. DE PROCESAMIENTO	+389, +595	+314, +430	+460, +514

**Tabla 6.** Ubicación de los elementos *cis* encontrados en las posibles regiones promotoras y 3' -UTR de la familia de genes *AtLEA18*.

En el gen *AtLEA18-3* solo pudimos analizar 407 pares de bases que hay entre la región codificante de este gen y el que le antecede y encontramos señales para la expresión genética

en eucariotes, como el motivo TATA y cuatro posibles cajas CAAT. Al analizar la secuencia nucleotídica de la región 3' del gen, encontramos dos posibles señales de poliadenilación, además de dos motivos UE.

La posición de cada elemento se enumeró basándonos en la primera letra del codón de inicio de la traducción como el sitio de inicio de la transcripción (+1), debido a que no ha sido posible determinar el sitio de inicio de la transcripción experimentalmente.



**Figura 7. Localización de posibles elementos que actúan en *cis* en las regiones 5' y 3' de los genes *AtLEA18*.**

### III.3 Identificación de genes homólogos a *PvLEA18* en otras plantas

Además de identificar genes homólogos al gen *PvLEA18* en *A. thaliana*, también llevamos a cabo un análisis para encontrar genes similares a *PvLEA18* en otras plantas; para esto se llevó a cabo un rastreo en los bancos de secuencias almacenados en National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante los programas BLASTp para la búsqueda en los bancos de secuencias de proteínas y tBLASTn para la búsqueda en los bancos de ESTs (Expressed Sequence Tag). En este rastreo encontramos que hay genes similares a *PvLEA18* en 56 plantas diferentes (datos no mostrados), incluidas las secuencias de nueve plantas leguminosas (ver **Fig. 8.A**), de 11 monocotiledóneas (ver **Fig. 8.B**) y dos gimnospermas. Fuimos incapaces de detectar secuencias similares en plantas inferiores (helechos, briofitas, hepáticas), algas u organismos no vegetales.

#### (A) .

Pvulgaris	1	ME--KEKKTES	EQGKVNLEG-----	LPTE--DSPYVVKYKDLEDYKQ	QGYGTQGHQE
Vunguiculata	1	MEQEKERKTES	ESEKERLEG-----	LPIE--DSPYVQYKDLEDYKQ	QGYGTQGHQE
Ahypogaea	1	MENKEE---	NREKKTQNNESAK	ESSSTEELL	PME--DSPYVVKYKDLEDYK
Ctetragonoloba	1	-----TRE	-----	SPYLQYKDLEDYK	KGYGTQGHQE
Gmax	1	MEKQQQAPSKE	TKAQSDESVKES	SSTEG--LPME--	DSPYVVKYKDLEDYK
Psativum	1	MEKQTEKET	TKPTTENE	PGKDS	TEG-----V
Vfaba	1	MEKQPKET	TKPTNEAE	QKES	TEE-----V
Mtruncatula	1	MEKQTEKET	TKPTTNEA	SKGNI	EG-----L
Cjubata	1	MEKOMVKT	TKPTNQS--	NKES	IEG-----L

Pvulgaris	48	47PKT	GRGAGATEAP	TLSGAAFSS	SKSQATGTGATN	HK---	82
Vunguiculata	50	49PKT	GRGAGATEAP	TLSGAALSS	QSEATATGANN	HKGVP	87
Ahypogaea	57	56PKP	GRGAGATDAP	TSGAAVSSE	AELSAEAVN	RQGVP	94
Ctetragonoloba	28	27PKV	GRGAGATEAP	TLSGAAVSSE	DEVAATDV	INSKGVN	65
Gmax	58	57PKT	GRGAGATEAP	TLSGAAVSS	DAQVAATDA	INSKGVN	95
Psativum	55	54PTE	GRGAGSTEAP	TLSGANVSSE	AQFKAADAVN	RE	GVP
Vfaba	55	54PTE	GRGAGSTE	PTLSGAHVSSE	AEFKAVEAVN	R	GVP
Mtruncatula	54	53PQP	GRGAGATEAP	TLSGANVSSE	AKFNAANAVN	S	KGVP
Cjubata	52	51PKS	GRGAGATEAP	TLSGANVSSE	AQFTATNAV	N	R

#### (B) .

Sbicolor	1	MEAAKER	QQ-QQRKAA	EGGDTVQLP	TETSPYVRY	---	EGIEDYKMRGYGAQGHLPVS
Sofficinarum	1	MEVTKER	QQ-QQRKAA	EGGSDTVQLP	TETSPYVOY	---	EGLEDYKMRGYGAQGHLPVS
Zmays	1	MEAAKER	---QQRKAA	EGGSTTVQLP	TETSPYVOY	---	EGLEDYKMRGYGAQGHLPVS
Pvirgatum	1	MEAAKER	---RE-RRAD	-EGDAVQLP	TETSPYVRY	---	EGLEDYKMRGYGAQGHLPVS
Cdactylon	1	MEATKER	---REQRKAG	DAEGNTVQLP	TETSPYVOY	---	DNLEDYKMRGYGAQGHLPVS
Hvulgare	1	MEATKER	RE---QKAG	---DSVQLP	TETSPYVOY	NKDD	GLLEDYKMRGYGAQGHLPVS
Taestivum	1	MEAAKER	RE---RKAAGA	GEGGDSVQLP	TETSPYVOY	KKDD	GLLEDYKMRGYGAQGHLPVS
Pspicata	1	MEAAKE	GREQQRKAAGA	GEGAGSVQLP	TETSPYVOY	KKDD	GLLEDYKMRGYGAQGHLPVS
Osativa	1	MEATKE	TQQ---QQQRK	PDAGD	TVQLP	MTSPYVOY	KKDD
Llongituba	1	QEQEKE	Q---QQRK	---AVQELP	TES	SPYVNY	---
Pvulgaris	1	MEKEKT	---ESEQC	---KVNLEGLP	TES	SPYVKY	---
Csativus	1	-TRANKE	---KKEQE	---EVK---	LP	TES	SPYVGH

Sbicolor	57	56	DVPHGGSGTEAPTVPGTALPVAITKGRGPDDVQTQRDLGGGGG---VGR-PG	TATD
Sofficinarum	56	55	DVPHGGSGNEAPTVPGTALPVAIQQR---DDVQQRDLGAGGGGGDVGRRPG	DTVTD
Zmays	54	53	DVPHGGSGTEAPTVPGTALPVAIPKRR---DDVQQRDLGGDGGGG-VRR-PG	DTSTD
Pvirgatum	52	51	DVPHGGSGTDAPTVPGTAVPVAIPKGRDDVEPLPQRELGTAGKDDAGR---G	ASAD
Cdactylon	54	53	DVPHGGSGTDAPTVPGTAVPVAIPQKHDDDLVLPQRGQLGG---DAARR---G	DTATD
Hvulgare	52	51	DVPHG---SGTDAPTIPGTALPTQHLNLHGRQQPQR-----GAGVR---RTDAD	AAATD
Taestivum	58	57	DVPHG---SGTDAPTIPGTAFPTLHNLHGRQQPQRGAQGGGAGVR---RTDDD	AAATD
Pspicata	61	60	DVPHG---SGTDAPTIPGTALPTEHLNLHGRQQPQRGAQGGGAGVG---RTDDD	ATATD
Osativa	58	57	DVPHGGCGTDAPTIPGTAVPVAIQ-----RRHQGDAAAAAGTG---RVD---	TATD
<b>Llongituba</b>	47	46	DIHQHGGSTDAPTLSGSSLSSESQ-----	HETD
<b>Pvulgaris</b>	50	49	TGRGAGATEAPTLSGAAFSKSSQ-----	ATGTG
<b>Csativus</b>	45	44	VDRGSGGTDAPTLSGAGTIS-EAE-----	AKAAD

Sbicolor	110	AIN	112	RHGVP	117
Sofficinarum	111	AIN	113	RHGVP	118
Zmays	107	AIN	109	RHGVP	114
Pvirgatum	107	VIN	109	RHGVP	114
Cdactylon	107	AIN	109	RHGVP	114
Hvulgare	100	AIN	102	RHGVP	107
Taestivum	111	TIN	113	RHGVP	118
Pspicata	114	AIN	116	RHGVP	121
Osativa	105	AIN	107	HGVVP	112
Llongituba	75	PVR	77	HGVVP	82
Pvulgaris	78	ATN	80	H---	82
Csativus	72	PVT	74	R----	75

**Figura 8. Alineamiento de las secuencias homólogas a la proteína PvLEA18 encontradas en otras plantas.** En el panel (A) se muestra un alineamiento entre las proteínas LEA18 de plantas leguminosas y en el panel (B) se muestra un alineamiento entre frijol y plantas monocotiledóneas, indicándose con un cuadro una secuencia adicional específica de plantas monocotiledóneas. En cuadros negros se marcan los aminoácidos idénticos y en cuadros grises los similares.

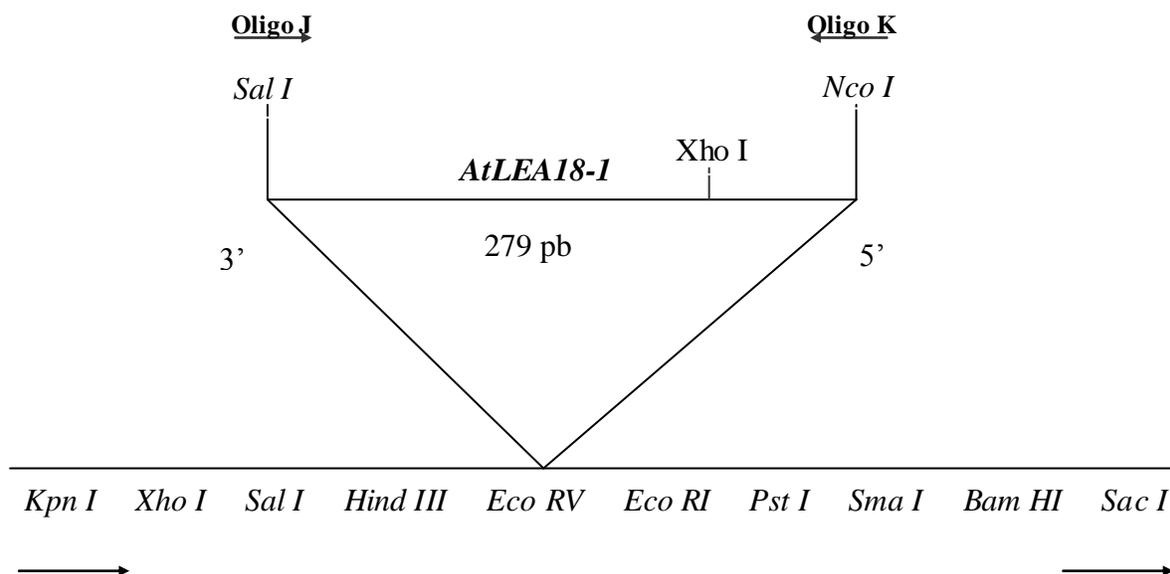
Como se puede ver en la **Figura 8**, en general las proteínas pertenecientes a la familia LEA18 son proteínas pequeñas, hidrofílicas y con regiones muy conservadas, ricas en tirosina y glicina. Se observa una conservación de tirosinas y prolinas en la mayoría de las secuencias analizadas. También observamos que las proteínas de las plantas monocotiledóneas son más grandes que las de las dicotiledóneas, ya que presentan una secuencia adicional cerca del carboxilo-terminal que no se encuentra en proteínas de otras plantas (**Fig. 8**). Sin embargo, a pesar de que *Lycoris longituba* y *Crocus sativus* pertenecen al grupo de plantas monocotiledóneas, no presentan dicha secuencia (**Fig. 8B**).

No obstante que las proteínas LEA típicas carecen de cisteínas, encontramos que las proteínas similares a PvLEA18 de betabel, alfalfa, tomate, pino y arroz poseen al menos una (dato no mostrado).

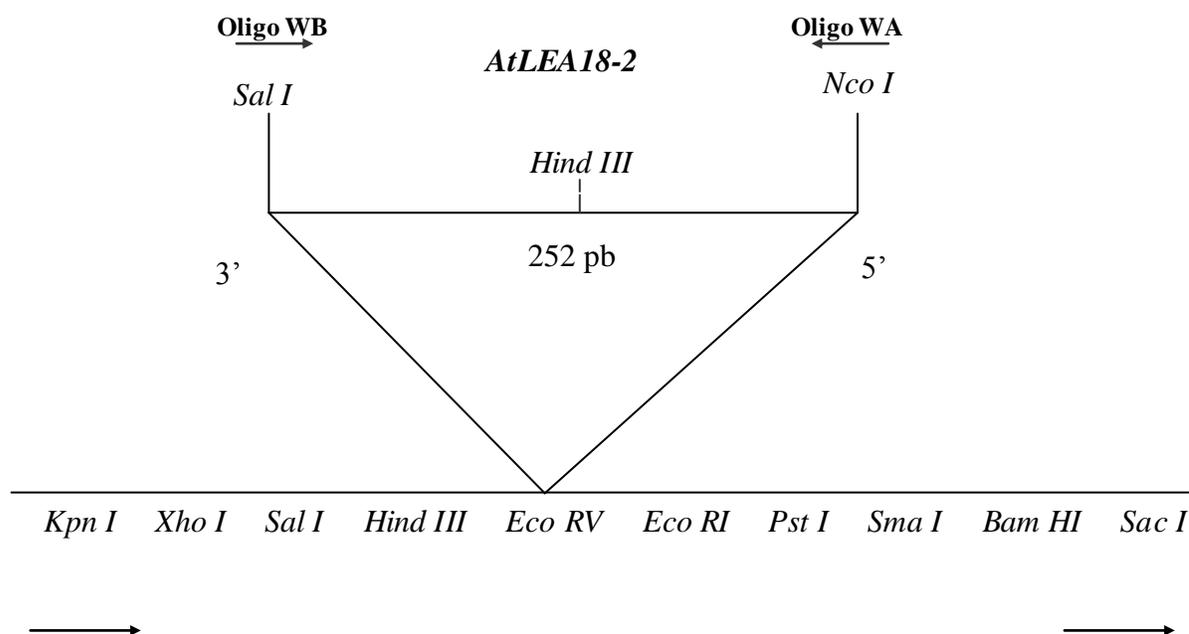
### III.4 Análisis de la expresión de los genes *AtLEA18* en *Arabidopsis thaliana*

#### III.4.1 Aislamiento y clonación de los ORFs de los genes *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2*

A partir de las regiones codificantes de los genes *AtLEA18*, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada gen. La región codificante de los genes *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2* se amplificó por la técnica de PCR a partir de un banco de cDNA de Lacroute (Minet *et al.*, 1992) y los productos de PCR obtenidos se clonaron en el vector pKS<sup>+</sup> en el sitio *Eco* RV y se mapearon con algunas enzimas de restricción (ver Materiales y Métodos; **Figs. 9** y **10**).



**Figura 9.** Diagrama de la clonación del gen *AtLEA18-1* dentro del plásmido pKS<sup>+</sup> y los oligonucleótidos específicos diseñados.



**Figura 10.** Diagrama de la clonación del gen *AtLEA18-2* dentro del plásmido pKS<sup>+</sup> y los oligonucleótidos específicos diseñados.

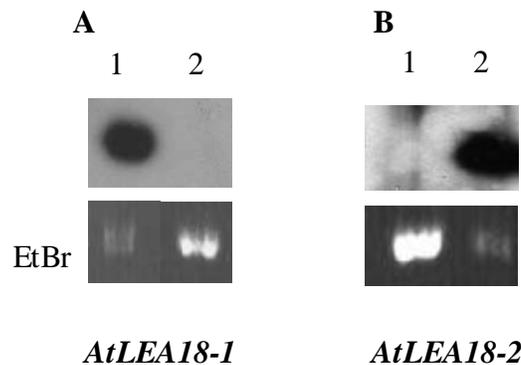
Los cDNAs obtenidos fueron completamente secuenciados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto y los resultados mostraron que la secuencia de los cDNAs de *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2* son 100% idénticas a las de las secuencias almacenadas en la base de datos del proyecto de secuenciación del genoma de *A. thaliana*, por lo que se pudieron utilizar confiablemente ambos genes para los experimentos posteriores.

#### III.4.2 Análisis del patrón de hibridación entre los genes *AtLEA18*

Debido a la necesidad de contar con sondas específicas para analizar la expresión de los genes tipo *LEA18* en *A. thaliana*, se hizo un análisis tipo Southern en condiciones estrictas (Church y Gilbert, 1984; ver Materiales y Métodos) para determinar si era posible usar la región codificante de ambos genes como sonda específica para ensayos posteriores sin que hubiera hibridación cruzada entre ellos. Como podemos ver en la **Figura 11**, al usar como sonda la región codificante del gen *AtLEA18-1* no observamos hibridación cruzada con el gen

*AtLEA18-2*, a pesar de que en el gel se cargó el triple de DNA de *AtLEA18-2* (**Fig. 11A, carril 2**) que de *AtLEA18-1* (**Fig. 11A, carril 1**). Al usar como sonda la región codificante del gen *AtLEA18-2* encontramos que tampoco hay hibridación cruzada, no obstante que se cargó una mayor cantidad de DNA del gen *AtLEA18-1* (**Fig. 11B, carril 1**). El cDNA del gen *AtLEA18-3* no se analizó en este trabajo.

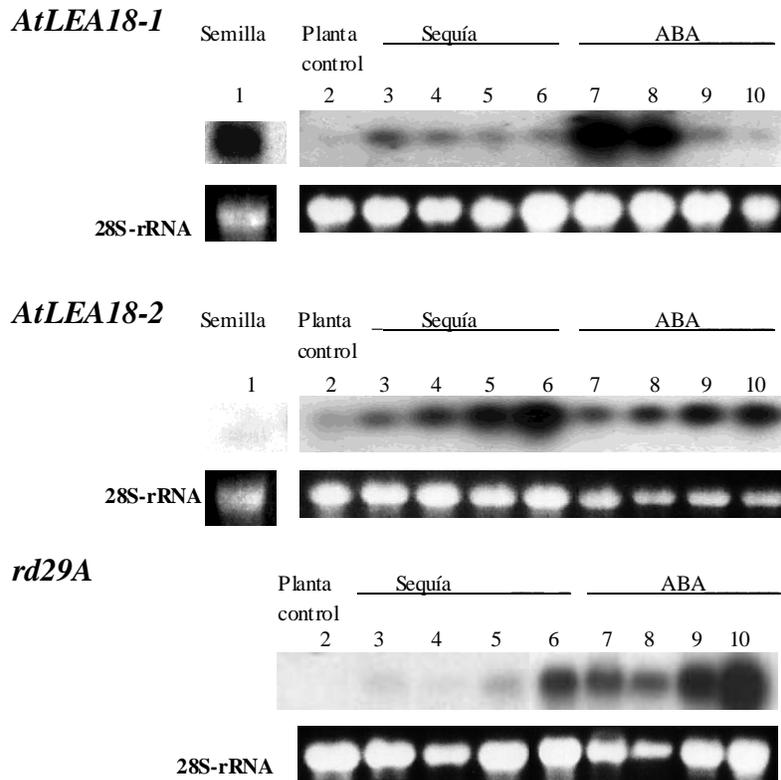
En base a estos resultados, decidimos utilizar como sondas específicas las regiones codificantes de los genes *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2* en los ensayos tipo Northern.



**Figura 11. Análisis del patrón de hibridación entre los genes *AtLEA18*.** Se llevaron a cabo ensayos tipo Southern en condiciones estrictas para determinar el patrón de hibridación de los genes utilizando como sonda la región codificante del gen *AtLEA18-1* (A) y la del gen *AtLEA18-2* (B). Como control de carga se muestran los insertos liberados (*AtLEA18-1* o *AtLEA18-2*) del plásmido pKS<sup>+</sup>, a partir de una digestión con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HindIII*. Se muestran los gels de agarosa al 2% y teñidos con bromuro de etidio.

### III.4.3 Análisis de la expresión de los genes *AtLEA18* en *A. thaliana*

Para determinar la expresión de la familia de genes *AtLEA18* se analizó el RNA de A) semilla seca, B) plántulas de *A. thaliana* de tres semanas crecidas en cajas con medio MS en condiciones control, C) plántulas sometidas a estrés hídrico durante 3 ½, 7, 19 y 24 horas y D) plántulas tratadas con una solución de ABA 100 µM durante 3 ½, 7, 19 y 24 horas (ver Materiales y Métodos).



**Figura 12. Determinación de los niveles de acumulación del transcrito de los genes *AtLEA18* durante sequía y en la presencia de ABA.** Para determinar los niveles de acumulación de transcrito se llevaron a cabo experimentos tipo Northern, usando RNA total de plántulas de *A. thaliana* sometidas a sequía durante 3 ½, 7, 19 y 24 horas, (**3, 4, 5 y 6**) y tratadas con ABA durante 3 ½, 7, 19 y 24 horas, (**7, 8, 9 y 10**). Como sondas se utilizaron los ORFs de *AtLEA18-1* y *AtLEA18-2*; como control positivo de los tratamientos de sequía y ABA se utilizó como sonda un fragmento del gen *rd29A* y como control de carga se usó el patrón de tinción del RNA 28S teñido con bromuro de etidio.

En los resultados de los ensayos tipo Northern encontramos que la acumulación del transcrito del gen *AtLEA18-1* ocurre principalmente en semilla seca y a las 3 ½ y 7 horas del tratamiento con ABA. Detectamos una menor acumulación a las 3 ½ y 7 horas del tratamiento de deshidratación y muy poca en las plántulas crecidas en condiciones óptimas (**Fig. 12A**). Para lograr detectar la expresión del gen *AtLEA18-1* fue necesario exponer por varios días

(nueve días).

En el caso del gen *AtLEA18-2* (**Fig. 12B**), la acumulación de transcrito en las cinéticas de los tratamientos de estrés hídrico y aplicación de ABA ocurre de forma contraria con respecto a *AtLEA18-1*; en ambos tratamientos se encontró que aumentó la acumulación de transcrito progresivamente, observándose en mayor cantidad a las 24 horas. Además, la acumulación de transcrito de *AtLEA18-2* detectada en semilla seca es ligeramente menor que en plántulas crecidas en condiciones óptimas y significativamente menor que en *AtLEA18-1*; el gen *AtLEA18-2* se detectó a las 24 horas de exposición del film con la membrana, un resultado similar se obtuvo con gen *rd29A*.

Como control positivo de inducción por sequía y tratamiento exógeno con ABA se usó el gen *rd29A* de *A. thaliana* (**Fig. 12C**), el cual se induce bajo condiciones de deshidratación a los 20 minutos de iniciada la sequía y por tratamiento con ABA exógeno a las 2 horas (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1993). En este trabajo se observó un aumento progresivo de la acumulación del transcrito del gen *rd29A* a partir de las 3 ½ horas en ambos tratamientos, sequía y ABA (el hecho de que no se observe una gran inducción por sequía de este gen es debido al tiempo de exposición de la membrana).

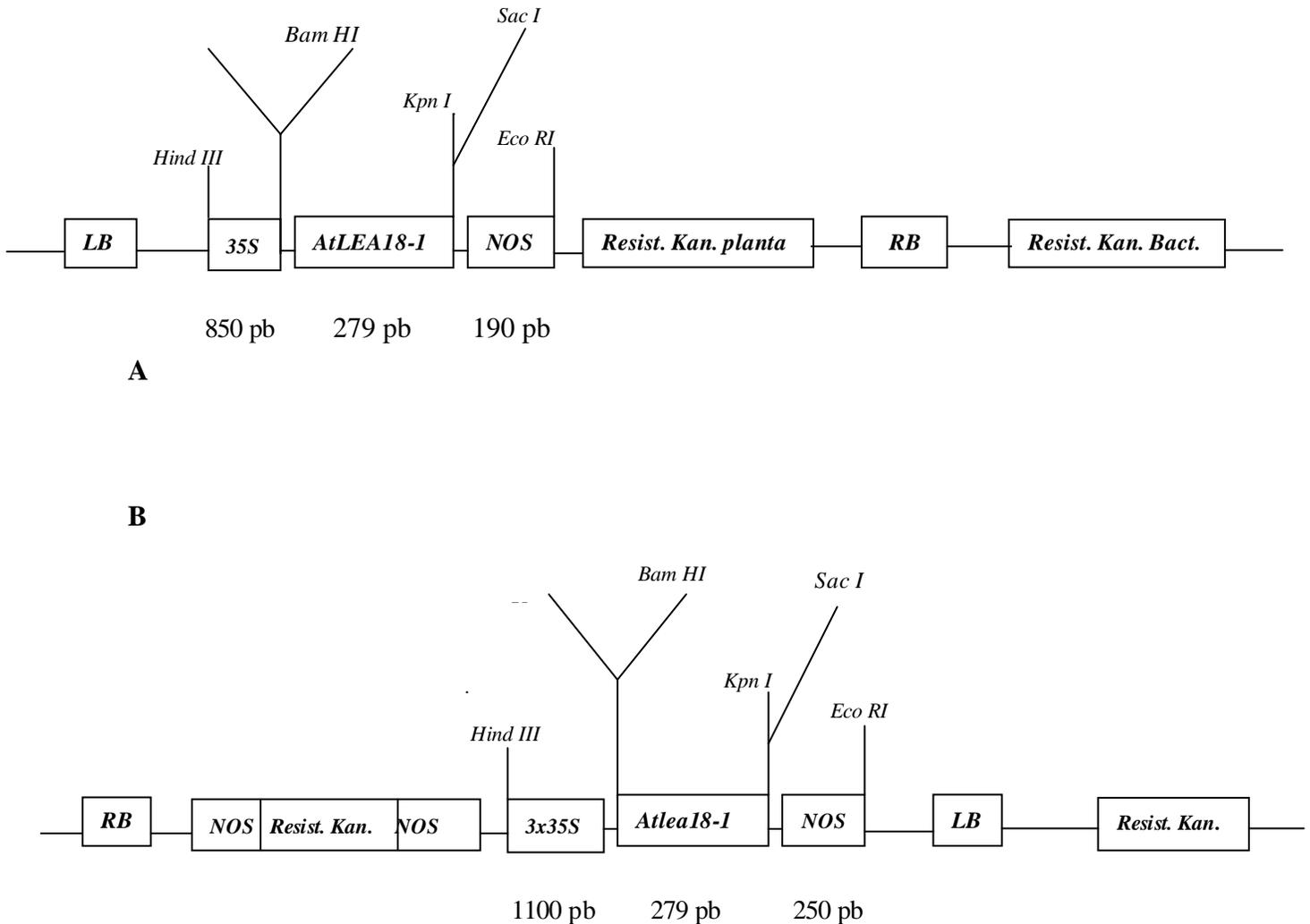
### III.5 Obtención de plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *AtLEA18-1*

#### III.5.1 Sobreexpresión del gen *AtLEA18-1* en plantas de *Arabidopsis thaliana*

Para obtener plantas transgénicas de *A. thaliana* que sobreexpresaran el gen *AtLEA18-1*, se clonó el ORF de este gen, que previamente había sido clonado en el vector pKS<sup>+</sup>, en los vectores binarios bajo la regulación del promotor del virus del Mosaico de la coliflor, 35S o 35S triplicado y la región 3' del gen *nos* (*nopalina sintasa*). Como controles se manejaron los vectores sin el gen de *AtLEA18-1*, por lo que finalmente trabajamos con cuatro construcciones: 1) pBin35S-3'*nos*, 2) pBin35S-*AtLEA18-1*-3'*nos*, 3) pBin3x35S-3'*nos* y 4) pBin3x35S-*AtLEA18-1*-3'*nos*. En la **Figura 13** se muestra la posición en la que se clonó el gen *AtLEA18-1* dentro del vector pBin35S (**Fig. 13A**) y pBin3x35S (**Fig. 13B**).

Se transformaron 25 plantas de *A. thaliana* de cuatro semanas para cada construcción, usando el método de infiltración con *A. tumefaciens* (descrito en Materiales y métodos); la

semilla de la primera cosecha ( $T_0$ ) de cada construcción se obtuvo por separado y se seleccionaron las transformantes por su resistencia a kanamicina en medio MS. De esta selección se obtuvieron: 1) 14 líneas independientes de *35S-nos*, 2) ocho líneas con el transgen *35S-AtLEA18-1-nos*, 3) 10 líneas *3x35S-nos* y 4) nueve líneas con el transgen *3x35S-AtLEA18-1-nos*; en la **Tabla 7** se muestra un resumen con los resultados obtenidos de la transformación.



**Figura 13. Diagrama de la clonación del gen *AtLEA18-1* en el plásmido pBin35S (A) y en el plásmido pBin3x35S (B).** Se muestra la posición del gen, del promotor, del terminador y de los marcadores de resistencia a antibiótico dentro de los plásmidos.

CONSTRUCCION	PLANTAS TRANSFORMADAS	TOTAL DE SEMILLA COLECTADA	SEMILLAS SEMBRADAS POR CAJA	CAJAS	PLANTAS RESISTENTES A KANAMICINA	PLANTAS QUE SOBREVIVIERON EN SUELO	PROPORCION DE TRANSFORMACION
1. 35S - nos	25	42500	1250	34	21	14	1 : 3036
2. 35S - <i>AtLEA18-1</i> - nos	25	33600	1250	28	11	8	1 : 3734
3. 3x35S - nos	25	33600	1250	28	13	10	1 : 3360
4. 3x35S - <i>AtLEA18-1</i> - nos	25	33600	1250	28	9	9	1 : 3734

**Tabla 7.** Reseña de la transformación y experimentos de selección de plantas transgénicas.

La semilla de cada línea independiente (generación T<sub>1</sub>) se cosechó por separado y después de esterilizarse superficialmente, se sembraron 100 semillas de cada una en medio de selección, 50 en cada caja, para determinar el porcentaje de segregación, que en general fue del 70% (**Tabla 8**); este porcentaje corresponde al esperado en base a la predicción de una segregación tipo Mendeliana. La segregación de las líneas en donde los porcentajes son del 90% o más puede ser explicado por la inserción de más de un transgen.

En este punto (generación T<sub>1</sub>), 15 plantas de cada línea se trasplantaron a macetas con Metro-Mix 200 y se crecieron hasta producir semilla. Esta semilla se cosechó individualmente y constituye la generación T<sub>2</sub>. Además, se congeló el tejido foliar de otras 10 plantas de cada línea de la generación T<sub>1</sub>, para los análisis Northern y Western.

		<b>Caja 1</b>	<b>Caja 2</b>
<i>35S - nos</i>	<b>Línea 1.2</b>	94% (47/50)	90% (45/50)
	<b>Línea 1.4</b>	92% (46/50)	92% (46/50)
	<b>Línea 1.5</b>	66% (33/50)	78% (39/50)
	<b>Línea 1.12</b>	80% (40/50)	66% (33/50)
	<b>Línea 1.14</b>	54% (27/50)	56% (28/50)
	<i>35S – AtLEA18-1 - nos</i>	<b>Línea 2.1</b>	78% (39/50)
<b>Línea 2.5</b>		88% (44/50)	98% (49/50)
<b>Línea 2.6</b>		92% (46/50)	92% (46/50)
<b>Línea 2.7</b>		84% (42/50)	74% (37/50)
<b>Línea 2.8</b>		88% (44/50)	96% (48/50)
<b>Línea 2.9</b>		92% (46/50)	88% (44/50)
<b>Línea 2.10</b>		76% (38/50)	74% (37/50)
<i>3x35S - nos</i>	<b>Línea 2.11</b>	92% (46/50)	90% (45/50)
	<b>Línea 3.1</b>	74% (37/50)	90% (45/50)
	<b>Línea 3.7</b>	16% (8/50)	34% (17/50)
	<b>Línea 3.11</b>	56% (28/50)	66% (33/50)
	<b>Línea 3.12</b>	26% (13/50)	42% (21/50)
<i>3x35S – AtLEA18-1 - nos</i>	<b>Línea 3.13</b>	78% (39/50)	64% (32/50)
	<b>Línea 4.1</b>	76% (38/50)	70% (35/50)
	<b>Línea 4.2</b>	20% (10/50)	18% (9/50)
	<b>Línea 4.3</b>	22% (11/50)	26% (13/50)
	<b>Línea 4.4</b>	22% (11/50)	24% (12/50)
	<b>Línea 4.5</b>	20% (10/50)	18% (9/50)
	<b>Línea 4.6</b>	70% (35/50)	74% (37/50)
	<b>Línea 4.7</b>	14% (7/50)	20% (10/50)
	<b>Línea 4.8</b>	76% (38/50)	80% (40/50)
<b>Línea 4.9</b>	78% (39/50)	72% (36/50)	

**Tabla 8.** Porcentaje de germinación de plantas transgénicas de *A. thaliana* generación T<sub>1</sub>. Plántulas de las líneas transgénicas *35S–AtLEA18-1–nos* y *3x35S–AtLEA18-1–nos*, además de sus controles, crecidas en cajas con medio MS-kanamicina para determinar el porcentaje de segregación de cada línea transgénica.

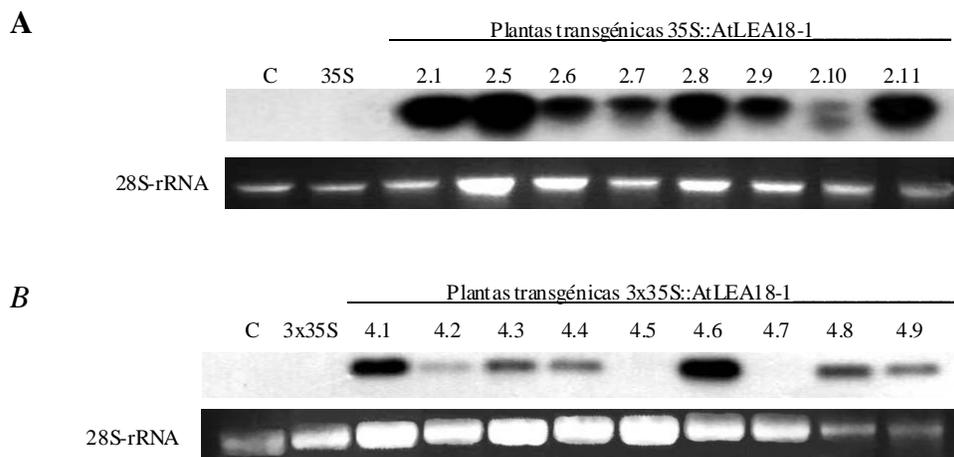
### III.5.2 Determinación de los niveles de transcrito del transgen *AtLEA18-1* en las líneas transgénicas

Para determinar si el transgen *AtLEA18-1* se estaba transcribiendo en las plantas

transgénicas obtenidas, se procedió a analizar los niveles de RNAm del transgen por medio de experimentos tipo Northern y utilizando como sonda la región codificante del gen. Para llevar a cabo este análisis se utilizaron 10 µg de RNA total de cada línea *35S-AtLEA18-1-nos* y *3x35S-AtLEA18-1-nos* y como controles se analizó el RNA total de una línea *35S-nos*, de una línea *3x35S-nos* (generación T<sub>1</sub>) y de plantas de *A. thaliana* tipo silvestre (Columbia).

Al determinar los niveles de transcrito para el transgen, detectamos que hay acumulación del transcrito del gen *Atlea18-1* en todas las líneas transgénicas en las que el gen está bajo el promotor 35S en una sola copia que en las líneas control (**Fig. 14A**).

Con respecto a las líneas transgénicas con el promotor triplicado, solo detectamos acumulación del RNAm en siete de las nueve líneas (**Fig. 14B**). Como se observa en la figura, la cantidad de transcrito acumulado en las diferentes líneas transgénicas no es la misma y no se observa acumulación del transcrito del gen endógeno, (esto durante el tiempo de exposición que se usó para observar la acumulación del transgen).



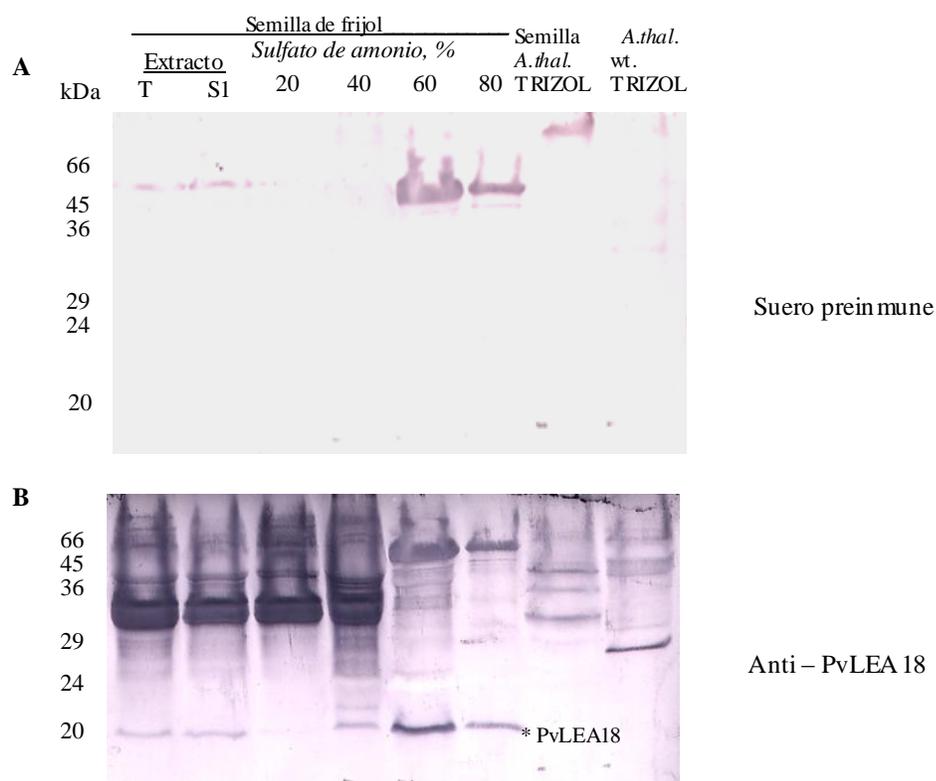
**Figura 14. Análisis de la sobreexpresión del gen *AtLEA18-1* en plantas transgénicas de la generación T<sub>1</sub>.** Ensayos tipo Northern usando RNA total de tejido foliar de plantas transgénicas de la generación T<sub>1</sub> de las líneas transgénicas *35S-AtLEA18-1-nos* (A) y de las líneas transgénicas *3x35S-AtLEA18-1-nos* (B). En ambos casos se usó RNA total de planta silvestre y de una línea *35S-nos* o *3x35S-nos* como controles. Como control de carga se muestra el 28S-rRNA teñido con bromuro de etidio.

### **III.6 Análisis de la sobreexpresión de la proteína AtLEA18-1 en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana***

Después de determinar que las plantas transgénicas obtenidas (35S-AtLEA18-1 y 3x35S-AtLEA18-1) mostraban niveles significativos del transcrito del transgen, se procedió a determinar por Western-blot los niveles de proteína recombinante en las líneas obtenidas.

#### **III.6.1 Detección de la proteína AtLEA18-1 con el anticuerpo anti-PvLEA18**

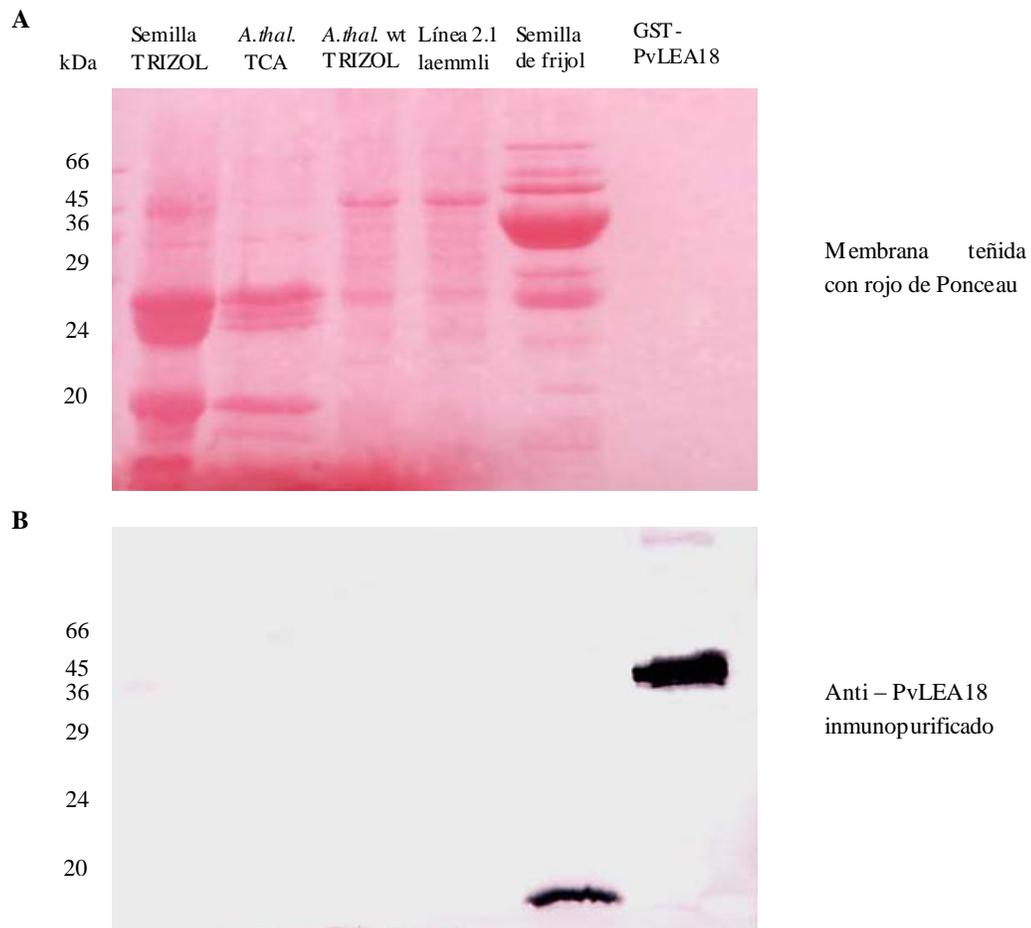
Ya que la proteína PvLEA18 tiene una similitud significativa con su homólogo de *Arabidopsis* AtLEA18-1, se analizó la posibilidad de que el anticuerpo anti-PvLEA18 pudiera detectar a AtLEA18-1. Como un paso previo para determinar si el anticuerpo dirigido contra una proteína de fusión, GST-PvLEA18 era capaz de reconocer a la proteína AtLEA18-1, se procedió a caracterizar este anticuerpo. Se analizaron las fracciones solubles y totales de semilla de frijol (ver material y métodos), así como las fracciones obtenidas del extracto soluble de semilla de frijol con sulfato de amonio y extractos de semilla de *A. thaliana*. Como se observa en la **Figura 15**, al llevar a cabo el western-blot con el suero inmune se encontró mucho fondo, ya que se detectaron proteínas de alto peso molecular en todas las fracciones analizadas. Sin embargo, es posible detectar una proteína de alrededor de 20 kDa en fracciones solubles y totales de semilla de frijol; esta proteína se enriquece en las fracciones de 40 a 80% de sulfato de amonio (**Fig. 15B**).



**Fig. 15. Inmunodetección de las proteínas PvLEA18 y AtLEA18-1 en plantas.** Ensayo tipo Western usando el anticuerpo anti-PvLEA18 en extractos proteicos totales de semilla y de plantas de *A. thaliana* y de semilla de frijol A) Incubación de los extractos proteicos con el suero preinmune y B) inmunodetección de las proteínas PvLEA18 y AtLEA18-1 en extractos proteicos de semilla, de plantas de *A. thaliana* y de semilla de frijol (total y enriquecido con sulfato de amonio) utilizando el anticuerpo anti-PvLEA18.

Dado que hay antecedentes (datos no publicados) de que la proteína PvLEA18 puede sufrir agregación y que Colmenero-Flores y colaboradores (1999) detectaron bandas de alto peso molecular al analizar extractos proteicos de semilla y de plantas de *A. thaliana*, podría haber la posibilidad de que la proteína AtLEA18-1 pudiera sufrir también de agregación y como consecuencia, tener un peso molecular más alto y no poder ser detectada por confundirse con el fondo que da el anticuerpo. Para excluir alguna de estas posibilidades, se procedió a inmunopurificar el anticuerpo anti-PvLEA18 y repetir este análisis (ver Material y

métodos). Al titularse el anticuerpo inmunopurificado se encontró que detectaba hasta 2.5 ng de la proteína GST – PvLEA18, usando el anticuerpo en dilución 1:500 en un ensayo Western blot. Este anticuerpo se probó con extractos proteicos de semilla de frijol, de semilla y de planta silvestre (crecida en condiciones controladas) de *A. thaliana* extraídos por varios métodos (TRIZOL, TCA, Laemmli) y de tejido foliar de una línea transgénica que sobreexpresa la proteína AtLEA18-1, además de usar como control positivo la proteína de fusión GST – PvLEA18 purificada; en los resultados del ensayo tipo Western encontramos que este anticuerpo sólo detecta a su antígeno en extractos proteicos bacterianos y de semilla de frijol (**Fig 16**).

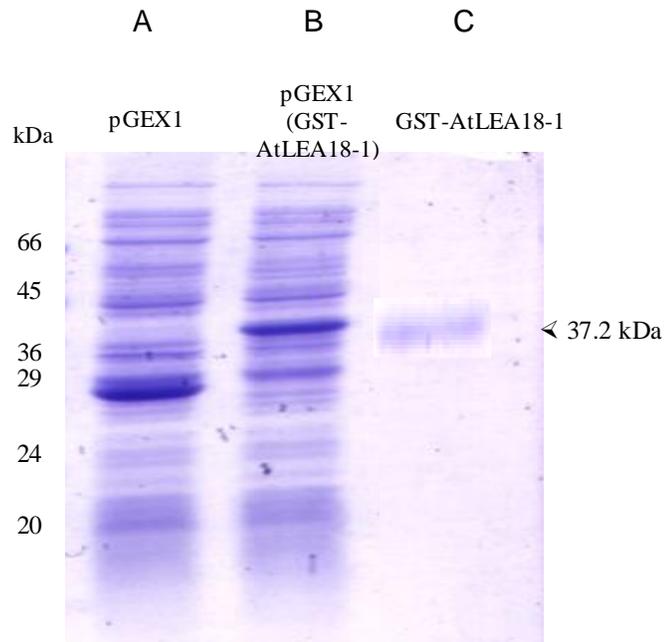


**Fig. 16. Inmunodetección de la proteína PvLEA18 y AtLEA18-1 con el anticuerpo anti-PvLEA18 inmunopurificado.** Ensayo tipo Western usando extractos proteicos totales de *A. thaliana* y frijol A) Análisis de las proteínas de los extractos proteicos en una membrana de

nitrocelulosa teñida con rojo de Ponceau y B) inmunodetección de las proteínas AtLEA18-1 y PvLEA18 en extractos proteicos de semilla y de plantas de *A. thaliana* y de semilla de frijol, además de 1µg de la proteína de fusión GST-PvLEA18 purificada, usando el anticuerpo anti-PvLEA18 inmunopurificado.

### **III.6.2 Generación de anticuerpos dirigidos contra la proteína AtLEA18-1**

Debido a que el anticuerpo anti-PvLEA18 no podía ser utilizado para detectar la proteína AtLEA18-1, se decidió generar un anticuerpo contra la proteína AtLEA18-1, clonando en el plásmido pGEX1 el gen que codifica para la proteína AtLEA18-1 y así generar una proteína de fusión GST-AtLEA18-1 (GST: glutatión-S-transferasa. Ver Material y métodos); el plásmido se introdujo en células de *E. coli* para inducir su expresión. Al analizar los patrones de expresión de proteínas en extractos totales de bacterias que poseen el plásmido con el gen quimérico, se detectó la acumulación de una proteína de aproximadamente 37.2 kDa, que es el peso esperado de la proteína de fusión GST-AtLEA18-1; en cambio, en los extractos control sólo se detectó la acumulación de una proteína de 27.5 kDa y la diferencia de peso corresponde a la proteína AtLEA18 (**Fig. 17**).



**Figura 17. Análisis de extractos proteicos totales en gel de SDS–PAGE al 15% teñido con azul de Coomasie.** Se analizaron los extractos totales de bacterias crecidas durante dos horas en presencia de IPTG y se observa: (A) acumulación de la proteína GST (27.5 kDa) en el extracto control con pGEX1, (B) acumulación de una proteína de aproximadamente 37.2 kDa en los extractos proteicos de bacterias que expresan el gen quimérico y (C) proteína GST-AtLEA18-1 purificada (100ng).

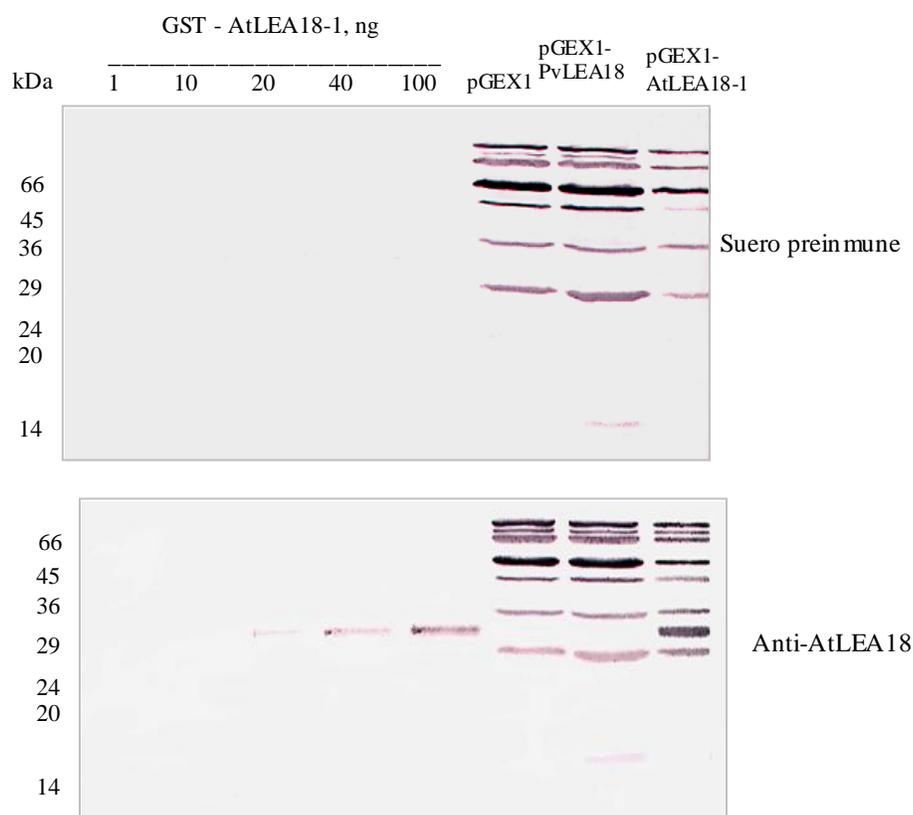
Para obtener una mayor cantidad de proteína de fusión para hacer las inmunizaciones y obtener el anticuerpo contra la proteína GST-AtLEA18-1, se hizo una inducción en mayor cantidad (cultivo de 500 ml) y se purificó la proteína de fusión por afinidad con perlas de glutatión-agarosa (**Fig. 17**, carril C. Ver Materiales y métodos). Con la proteína obtenida se inoculó un conejo para la producción de anticuerpos.

El suero no inmune del conejo previamente se probó en un análisis Western, utilizando los mismos extractos proteicos totales usados anteriormente y se observó que no reconoce tantas proteínas como el suero preinmune del anticuerpo anti-PvLEA18 (datos no mostrados).

Antes de hacer la titulación del anticuerpo, se hizo una cuantificación de la proteína de

fusión y se encontró que los extractos enriquecidos contenían 100 ng/ $\mu$ l de dicha proteína; la cantidad aproximada de proteína de fusión en los extractos se obtuvo al comparar un gel, teñido con azul de Coomasie, cargado con diferentes cantidades del extracto proteico, con otro gel cargado con cantidades conocidas de la proteína BSA, teñido con la misma solución.

Posteriormente se tituló el anticuerpo, usando una dilución 1:500, utilizando cantidades conocidas de la proteína de fusión en un análisis tipo Western, en donde se observó que el suero detectó hasta 20 ng de esta proteína; en este ensayo también observamos que el suero obtenido no reconoce la proteína GST-PvLEA18 (**Fig. 18**).

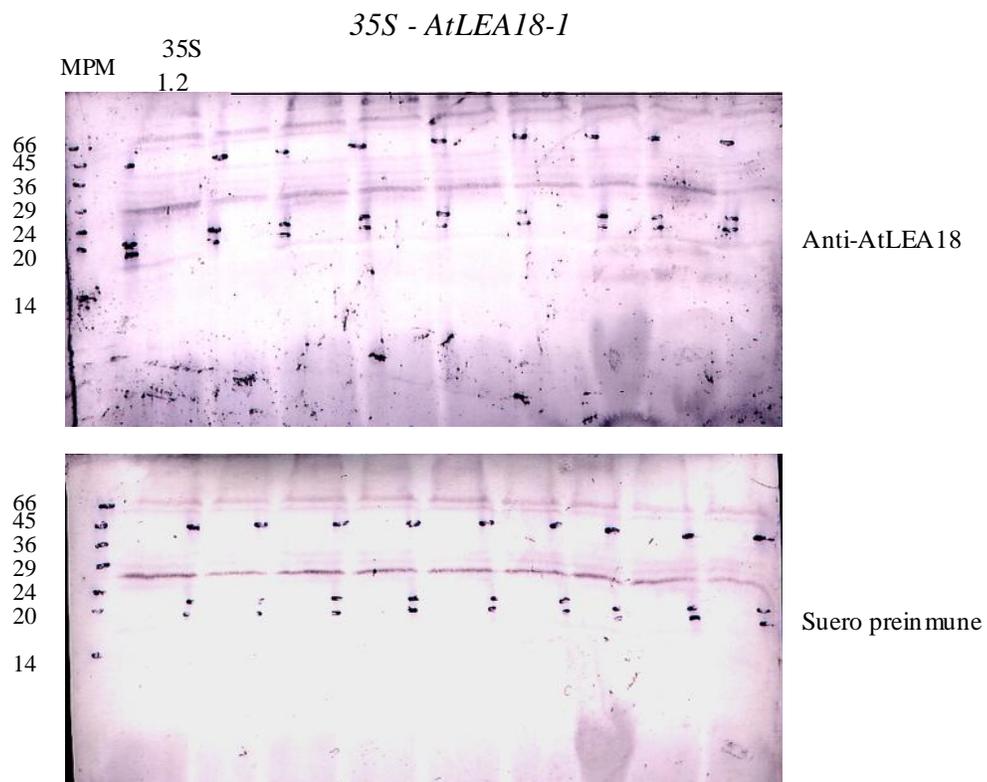


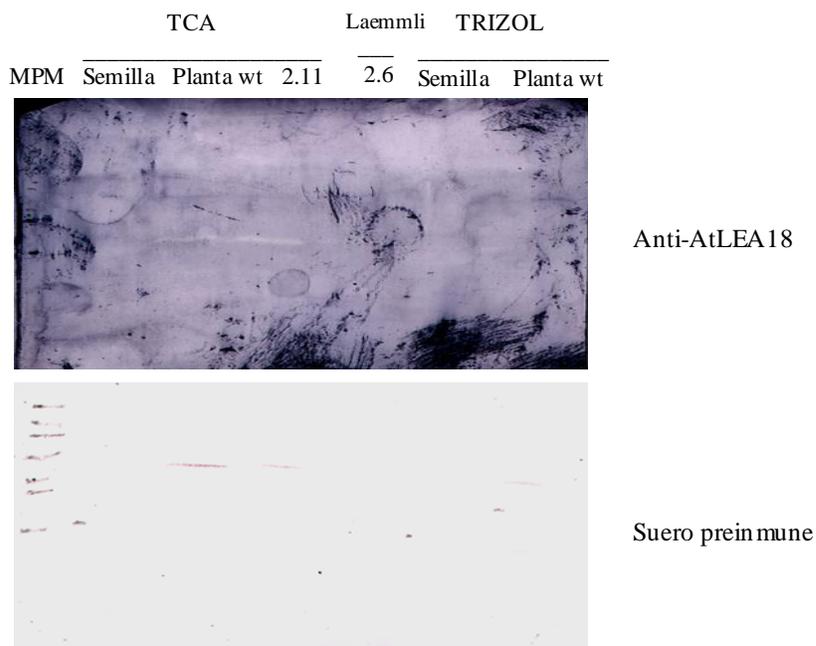
**Fig. 18. Titulación del anticuerpo anti-AtLEA18-1 e inmunodetección de la proteína AtLEA18-1.** Ensayo tipo Western donde observamos: A) Incubación de los extractos proteicos y de la proteína purificada con el suero preinmune y B) Titulación del anticuerpo utilizando distintas diluciones de la proteína de fusión purificada e inmunodetección de la proteína AtLEA18-1 en extractos proteicos que expresan GST, GST-AtLEA18-1 y GST-PvLEA18 utilizando el anticuerpo anti-AtLEA18-1.

### III.6.3 Detección de la proteína AtLEA18-1 en plantas

Al usar el anticuerpo anti-AtLEA18-1 contra proteínas totales de tejido foliar de plantas transgénicas de *A. thaliana* (*35S-AtLEA18-1*) extraídas con SDS al 5%, en un análisis tipo Western, se encontró que este anticuerpo no detectaba la acumulación de una proteína con un peso similar a AtLEA18-1 (**Fig. 19A**).

A



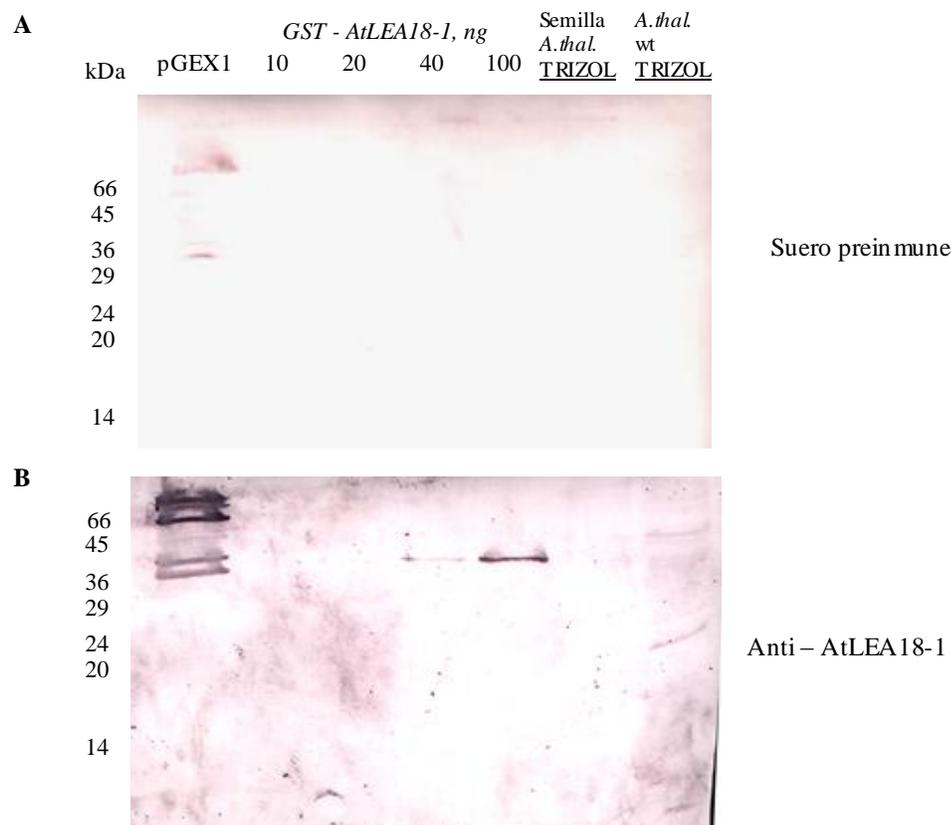
**B**

**Fig. 19. Inmunodetección de la proteína AtLEA18-1 en plantas.** A) Inmunodetección de la proteína AtLEA18-1 en extractos de proteínas extraídas con buffer Laemmli de las líneas transgénicas *35S -nos* y *35S - AtLEA18-1 - nos*. B) Inmunodetección de AtLEA18-1 en extractos proteicos de semilla y planta de *A. thaliana* obtenidos por precipitación con TRIZOL y TCA. Como control se muestra el resultado de la incubación de estos extractos con el suero preinmune.

Considerando que el método de extracción con SDS pudiera no ser eficaz para la extracción de la proteína AtLEA18-1, se usaron otros métodos de extracción para obtener proteínas totales, como el de TCA y extracción con el reactivo TRIZOL. El anticuerpo se probó sobre los extractos proteicos, obtenidos por estos métodos. Se analizaron extractos de semilla, planta silvestre y tejido foliar de plantas de la línea transgénica 2.11 (*35S-AtLEA18-1*); sin embargo, al llevar a cabo los análisis tipo Western, no se logró detectar alguna señal y los filtros presentaron un fondo muy alto (**Fig. 19B**).

Para tratar de eliminar el fondo y hacer más específico el anticuerpo, se enriqueció la fracción IgG del suero con sulfato de amonio saturado; el anticuerpo precipitado se volvió a

titular y se encontró que se detectaban aproximadamente 100 ng de GST-AtLEA18-1, pero la fracción de IgG's siguió presentando fondo. Pensamos que la pérdida del título y el alto fondo que presenta el suero inmune se debió a que el anticuerpo generado contra la proteína AtLEA18-1 sufrió alguna modificación (degradación, agregación, etc; datos no mostrados). Debido a esto se optó por usar otro lote de anticuerpo anti-AtLEA18-1, el cual reconocía hasta 40 ng de la proteína de fusión. Al repetir los análisis con este anticuerpo, no se encontró señal de alguna proteína en el rango de 10-20 kDa o a la altura del marcador de peso molecular en el que se observa la proteína PvLEA18 (14 kDa; **Fig. 20**).



**Figura 20. Segunda inmunodetección de la proteína AtLEA18-1.** Ensayo tipo Western usando otro lote de suero inmune en extractos proteicos totales bacterianos y foliares. A) Incubación de los extractos proteicos y de la proteína purificada con el suero preinmune y B) inmunodetección de la proteína AtLEA18-1 en extractos proteicos totales que expresan GST, de semilla y planta de *A. thaliana* y de distintas diluciones de la proteína de fusión purificada usando el anticuerpo anti-AtLEA18-1.

## IV. DISCUSIÓN

Las plantas poseen órganos capaces de resistir la pérdida de agua y así sobrevivir, éstos son la semilla y el polen. Se ha propuesto que varios componentes pueden participar para que esto suceda y entre éstos se encuentra un grupo de proteínas que se acumulan durante la última fase de la embriogénesis, llamadas proteínas LEA; estas proteínas han sido detectadas en angiospermas, gimnospermas, plantas inferiores y algas, por lo que se ha propuesto que las proteínas LEA son ubicuas en el reino vegetal y también se han detectado en otros organismos de otros reinos como son: insectos, nematodos, rotíferos y bacterias. Además, en plantas se ha encontrado que las proteínas LEA pueden acumularse en tejidos vegetativos en respuesta a déficit hídrico, frío, estrés salino o a la aplicación de ácido abscísico. Se han descrito siete grupos de proteínas LEA en base a su secuencia de aminoácidos y motivos conservados; uno de estos grupos fue identificado inicialmente en fríjol y se le ha denominado como Grupo 6 o LEA18. En este trabajo se ha presentado la identificación, organización genómica y expresión de las proteínas LEA del grupo 6 (o LEA18) de *Arabidopsis thaliana*. Se usó como modelo de estudio la planta *Arabidopsis thaliana* ya que hasta el momento, junto con arroz, su genoma se encuentra totalmente secuenciado (AGI, 2000).

Al llevar a cabo un análisis bioinformático en la base de secuencias de NCBI (National Center for Biotechnology Information) hemos encontrado que en el genoma de *Arabidopsis* existe una pequeña familia de genes que codifican para proteínas *LEA18*. Esta familia consta de tres miembros localizados en el cromosoma II y dos de estos genes se encuentran adyacentes uno de otro, lo cual indica un fenómeno reciente de duplicación. A estos tres genes los hemos denominado como: *AtLEA18-1* (At2g23110), *AtLEA18-2* (At2g23120) y *AtLEA18-3* (At2g33690), respectivamente. Estas proteínas poseen un porcentaje de similitud/identidad con *PvLEA18* de más del 52/47% y las secuencias nucleotídicas de sus genes presentan más del 51% de identidad con el gen de *PvLEA18*. Además, las proteínas *AtLEA18* poseen las características estructurales de las proteínas LEAs típicas, incluso las que se han observado en la *LEA18* de fríjol. Hasta el momento, solo en *Arabidopsis* hemos detectado que existe una familia de genes que codifican para proteínas LEA. Incluso en arroz, cuyo genoma se encuentra totalmente secuenciado, sólo se detecta un solo gen. También encontramos secuencias homólogas a *LEA18* en varias plantas como soya, jitomate, *Brassica rapa*, plantas

monocotiledóneas y gimnospermas, como pino.

Hemos encontrado que los miembros de la familia de LEA18 de *Arabidopsis* tienen una expresión diferencial: AtLEA18-1 se expresa en semilla, en sequía y se induce fuertemente por la presencia de ABA exógeno, en cambio AtLEA18-2 no se expresa en semilla y no se induce tanto por ABA y además se detecta su expresión en condiciones control, lo cual sugiere que esta proteína puede tener una función bajo condiciones normales y no sólo en estrés. Aunque inicialmente pensamos que *AtLEA18-3* podría ser un pseudogene ya que no habíamos detectado su transcrito en semilla seca, plántulas control y plántulas bajo estrés hídrico o tratadas con ABA (**datos no mostrados**), hemos encontrado, en la bases de datos de NCBI, un EST (**BE525272**) de semilla en formación similar a *AtLEA18-3*, por lo que se puede pensar que su expresión es muy baja y restringida a este estadio de desarrollo de la semilla. Además, Becerra (2006) detectó ESTs para este gen sólo en semillas inmaduras.

Al analizar las posibles regiones 5' y 3' de cada uno de los genes *AtLEA18*, encontramos elementos *cis* involucrados en la respuesta a estrés. En el caso de *AtLEA18-1*, observamos la presencia de un elemento tipo MYB involucrado en la regulación por ABA, dos motivos ABRE y un elemento *cis* llamado “coupling elements” (CE) que en conjunto forman un complejo mínimo que responde a ABA, (este complejo podría ser capaz de conferir la transcripción inducible por ABA; Shen *et al.*, 1996) y no se encontraron elementos tipo DRE. En el caso del gen *AtLEA18-2*, en su región promotora identificamos un elemento tipo MYB, involucrado en la regulación por ABA. También encontramos dos motivos ABRE y uno tipo DRE, esto nos indica que *AtLEA18-2* puede ser modulado por ABA, pero la presencia del elemento DRE nos infiere que puede ser regulado también por una vía independiente de ABA, por lo que también podría ser inducido por frío, lo cual ha sido reportado previamente (Seki *et al.*, 2001). Debido a que la región promotora del gen *AtLEA18-3* es muy pequeña (400 pb) y que en esta parte además está incluida la región 3-UTR del gen vecino, aunado a los datos de acumulación de transcrito, inicialmente habíamos pensado que el gen *AtLEA18-3* podría ser un pseudogene; sin embargo, la reciente identificación del EST mencionado en el párrafo anterior nos hace pensar que más bien la expresión de este gen es muy baja y se encuentra restringida a un estadio específico del desarrollo de la formación de la semilla. Al buscar posibles elementos en *cis* en la región promotora del gen *AtLEA18-3*, no encontramos alguna señal para estrés hídrico.

Nuestros resultados sugieren una expresión diferencial durante el estrés para esta familia; mientras que la máxima acumulación del transcrito de *AtLEA18-1* se detecta a tiempos tempranos (3.5 a 7.0 horas), *AtLEA18-2* tiene un pico de acumulación a tiempos más tardíos (19-20 hs). Un patrón similar se observa con ABA, además de que *AtLEA18-1* se expresa en semilla y *AtLEA18-2* no. Estos datos indican que podría existir una diversificación funcional para la familia de *LEA18* de *A. thaliana*.

Hemos generado plantas transgénicas que sobreexpresan el gen *AtLEA18-1* en *Arabidopsis thaliana*, y aunque hemos detectado una acumulación del transcrito en estas plantas, no hemos sido capaces de detectar la proteína correspondiente. Esto podría deberse a uno o varios factores, que incluirían:

- (a). Que la proteína *AtLEA18-1* se encuentra en tan poca cantidad que el anticuerpo no la alcanza a detectar.
- (b). Que el anticuerpo tiene un título muy bajo, pudiendo deberse esto a que el anticuerpo no fue generado solamente contra la proteína *AtLEA18-1*, sino contra una fusión (GST-*AtLEA18*).
- (c). Debido a algún mecanismo de regulación postraduccional la sobreexpresión de esta proteína causa su degradación.

Ya que fuimos incapaces de detectar la proteína recombinante, no se pudieron llevar a cabo experimentos para determinar la posible contribución de este gen a una posible resistencia al déficit hídrico.

## V. CONCLUSIONES

1. En el genoma de *Arabidopsis thaliana* existe una pequeña familia de genes que codifican para la *LEA18*. Hay tres genes *LEA18*.
2. La familia de *AtLEA18* se expresa diferencialmente:
  - (a). *AtLEA18-1* se expresa en semilla y su expresión es inducida fuertemente por ABA.
  - (b). *AtLEA18-2* se induce abundantemente por sequía, aunque no se expresa en semilla, su expresión no se induce tanto por ABA y se expresa en condiciones control.
  - (c). *AtLEA18-3* se expresa en niveles muy bajos durante la formación de la semilla.
3. Hemos detectado genes ortólogos a *LEA18* en otras plantas, incluidas monocotiledóneas y plantas gimnospermas.
4. Generamos plantas de *Arabidopsis* transgénicas (líneas T1 y T2) sobreexpresando el gen de *AtLEA18-1*, sin embargo, no pudimos detectar la sobreexpresión del transgene.

## VI. PERSPECTIVAS

En el presente trabajo se han identificado 3 genes similares a PvLEA18 en *Arabidopsis*. También se ha detectado que la expresión de algunos de los miembros de esta familia puede ser modulada por sequía, ABA y pueden estar presentes en semilla, estos datos apoyan la idea de que esta pequeña familia de proteínas corresponden a proteínas LEA, las cuales pueden estar involucradas en la tolerancia a la sequía en planta.

En un intento para determinar el posible papel de esta proteína durante el estrés hídrico se generaron plantas transgénicas de *Arabidopsis* sobre-expresando el gen de *AtLEA18-1* (ver sección III.5); sin embargo, no pudimos detectar la sobreexpresión del transgene. Otra estrategia para determinar la función de esta familia génica es el análisis de mutantes por inserción en la familia de *AtLEA18*, el análisis se llevaría en plantas con mutaciones en un solo gen (mutaciones sencillas) o generar mutaciones dobles y triples y con estas evaluar la respuesta de la planta al estrés, comparada con la planta silvestre.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., Shinozaki, K.** (1997) Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell*. **9**: 1859 – 1868.
- Allan, A. C., Fricker, M. D., Ward, J. L., Beale, M. H., Trewavas, A. J.** (1994) Two transduction pathways mediate rapid effects of abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Cell*. **6**: 1319 – 1328.
- Arroyo, A., Bossi, F., Finkelstein, R. R., León, P.** (2003) Three genes that affect sugar sensing (abscisic acid insensitive 4, abscisic acid insensitive 5, and constitutive triple response 1) are differentially regulated by glucose in *Arabidopsis*. *Plant Physiol. Sep*; **133** (1): 231 - 42.
- Artus, N. N., Uemura, M., Steponkus, P. L., Gilmour, S. J., Lin, C., Thomashow, M. F.** (1996) Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* *COR15a* gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*. **93**: 13404 – 13409.
- Ausubel, M. F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K.** (1995) Expression and Purification of Glutathione-S-Transferase Fusion Proteins. *Current Protocols in Molecular Biology*. **2**: 16.7.1 - 16.7.7
- Baker, J., Steele, C., Dure, L. III** (1988) Sequence and characterization of 6 *Lea* proteins and their genes from cotton. *Plant Mol Biol*. **11**: 277 – 291.
- Battaglia, M., Olvera-Carrillo, Y., Garcarrubio, A., Campos, F., Covarrubias, A.A.** (2008) The enigmatic lea proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol* **148**: 6-24
- Becerra, C.** (2006). Genes implicados en el desarrollo de la semilla de *Arabidopsis thaliana* (L.): Caracterización de los genes AtAnkTm. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de Barcelona.
- Bechtold, N., Ellis, J., Pelletier, G.** (1993) *planta* *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Acad. Sci. Paris Sci. Vie/Life Sci*. **316**: 1194 - 1199.
- Bies-Ethève, N., Gaubier-Comella, P., Debures, A., Lasserre, E., Jobet, E., Raynal, M., Cooke, R., Delseny, M.** (2008) Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol*

Biol. **67**:107–124

**Birnboim, H. C., Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**: 1513.

**Bohnert, H. J., Sheveleva, E.** (1998) Plant stress adaptations- making metabolism move. *Current Opinion in Plant Biology.* **1**: 267 – 274.

**Boyer, J. S.** (1982) Plant productivity and environment. *Science.* **218**: 443 – 448.

**Bray, E.** (1993) Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* **103**: 1035 – 1040.

**Bray, E.** (1997) Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Sci.* **2**: 48 – 54.

**Bray, E., Bailey-Serres, J., Weretilnyk, E.** (2000). Responses to Abiotic Stress. In *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, edited by B. Buchanan, W. Gruissem, R. Jones. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland. Chap. 5. Pags: 208 – 213. Chap. 22. Pags: 1158 – 1202,.

**Browne, J., Tunnacliffe, A., Burnell, A.** (2002) Plant desiccation gene found in a nematode. *Nature.* **416**: 38.

**Busk, P. K., Jensen, A. B., Pagès, M.** (1997) Regulatory elements *in vivo* in the promoter of abscisic acid responsive gene *rab17* from maize. *Plant J.* **11**: 1285 – 1295.

**Busk, P. K. and Pagès, M.** (1998) Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol.* **37**: 425 – 435.

**Cellier, F., Conejero, G., Breitler, J-C, Casse, F.** (1998) Molecular and physiological responses to water deficit in drought-tolerant and drought-sensitive lines of sunflower. *Plant Physiol.* **116**: 319 - 328.

**Chandler, M. P., and Robertson, M.** (1994) Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **b**: 113 – 141.

**Choi, H., Hong, H. J., Ha, J., Kang, J. Y., Kim, S. Y.** (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem.* **275**: 1723 – 1730.

**Chomczynski, P., and Sacchi, N.** (1987) Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal Biochem.* **162**: 156 – 159.

**Church, G. M., Gilbert, W.** (1984) Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**: 1991 - 1995.

**Close, T. J., and Lammers, P. J.** (1993) An osmotic stress protein of cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins. *Plant Physiol.* **101**: 773 – 779.

- Close, T. J., Fenton, R. D., Moonan, F.** (1993a) A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxyl terminal peptide. *Plant Mol Biol.* **23**: 279 – 286.
- Close, T. J., Fenton, R. D., Yang, A., Asghar, R., DeMason, D. A., Crone, D. E., Meyer, N. C., Moonan, F.** (1993b) Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. *Curr Top Plant Physiol.* **10**: 104 – 118.
- Close, T. J.** (1996) Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins. *Physiol Plant.* **97**: 795 - 803.
- Close, T. J.** (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant.* **100**: 291 – 296.
- Clough, S. J., Bent, A. F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16** (6): 735 – 743.
- Colmenero-Flores, J.M.** (1997) Caracterización de genes que responden a déficit hídrico en *Phaseolus vulgaris* L. Tesis de Doctorado en Biotecnología. IBT - UNAM.
- Colmenero-Flores, J.M., Campos, F., Garcarrubio, A., Covarrubias, A.A.** (1997) Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Mol Biol.* **35**: 393 - 405.
- Colmenero-Flores, J. M., Moreno, L.P., Smith C.E., Covarrubias, A.A.** (1999) Pvlea-18, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiol.* **120**: 93 - 103.
- Cutler, J. A., and Krochko, E. J.** (1999) Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci.* **4**: 472 – 478.
- Danyluk, J., Perron, A., Houde, M., Limin, A., Fowler, B., Benhamou, N., Sarhan, F.** (1998) Accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell.* **10**: 632 – 638.
- Dure, L. III** (1993a) in *Plant Responses to Cellular Dehydration during Environmental Stress*. Close, T. J., Bray, E. A. eds. **10**: 91 – 103.
- Dure, L. III** (1993b) A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant J.* **3**: 363 - 369.
- Espelund, M., Saebøe-Larsen, S., Hughes, D. W., Galau, G. A., Larsen, F., Jakobsen, K. S.** (1992) Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic and osmotic stress. *Plant J.* **2**: 241 –

252.

**Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.** (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem.* **132**: 6 – 13.

**Galau, G. A., Hughes, D. W. and Dure, L. III** (1986) Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis abundant (*lea*) mRNAs. *Plant Mol Biol.* **7**: 155 – 170.

**Galau, G. A., Wang, H. Y. C., Hughes, D. W.** (1992) Cotton *Lea4* (D19) and *LeaA2* (D132) group 1 *Lea* genes encoding water stress- related proteins containing a 20-amino acid motif. *Plant Physiol.* **99**: 783 – 788.

**Galau, G. A., Wang, H. Y. C. and Hughes, D. W.** (1993) Cotton *Lea5* and *Lea14* encode atypical late embryogenesis-abundant proteins. *Plant Physiol.* **101**: 695 – 696.

**Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J. M., Garcarrubio, A., Covarrubias, A. A.** (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem.* **275**: 5668 – 5674.

**Giraudat, J.** (1995) Abscisic acid signaling. *Current Opinion in Cell Biology.* **7**: 232 – 238.

**Giraudat, J., Parcy, F., Bertauche, N., Gosti, F. J. L., Morris, P. C., Bouvier-Durand, M., and Vartanian, N.** (1994) Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Mol Biol.* **26**: 1557 – 1577.

**Goday, A., Jensen, A. Culiáñez-Macià, F.A., Albà, M.M., Figueras, M., Serratos, J., Torrent, M., Pagés, M.** (1994) The maize abscisic acid responsive protein *rab17* is located in the nucleus and cytoplasm and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell.* **6**: 351 - 360.

**Graber, J. H., Cantor, C. R., Mohr and Smith, T. F.** (1999) *In silico* detection of control signals: mRNA 3'-end-processing sequences in diverse species. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 14055 – 14060.

**Guiliano, G., Pichersky, E., Malik, V. S., Timko, M. P., Scolnik, P., Cashmore, A. R.** (1988) An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **85**: 7089 - 7093.

**Harlow, E., Lane, D.** (1988) *Antibodies: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory eds. Cold Spring Harbor, NY. **1**: 61-113.

**Harlow, E., Lane, D.** (1988b) *Antibodies: a laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory eds. Cold Spring Harbor, NY. 298 - 230.

- Heyen, B. J., Alsheikh, M. K., Smith, E. A., Torvik, C. F., Seals, D. F., Randall, S. K.** (2002) The calcium-binding activity of a vacuole-associated, dehydrin-like protein is regulated by phosphorylation. *Plant Physiol.* **130**: 675 – 687. *Plant Journal.* 19(6):679-689
- Hincha, DK., Thalhammer A.** (2012) LEA proteins: IDPs with versatile functions in cellular dehydration Tolerance. *Biochem Soc Trans* **40**:1000-1003
- Hobo, T., Asada, M., Kowyama, Y., Hattori, T.** (1999) ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent. *Plant Journal.* **19**: 679-689
- Hoekstra, F. A., Golovina, E. A., Buitink, J.** (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* **6**: 431 – 438.
- Hundertmark, M., Hincha, D.K.** (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics*, **9**: 118- 138
- Imai, R., Chang, L., Ohta, A., Bray, E.A., Takagi, M.** (1996) A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* **170**: 243 - 248.
- Ingram, J., Bartels, D.** (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**: 377 - 403.
- Ish-Horowicz, D., Burke, J. F.** (1981) Rapid and efficient cosmid vector cloning *Nucleic Acid Res.* **9**: 2989.
- Ismail, A. B., Hall, A. E., and Close, T. J.** (1999) Purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiol.* **120**: 237 – 244.
- Iwasaki, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (1995) Identification of a *cis* regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Mol Gen Genet.* **247**: 391 – 398.
- Izawa, T., Foster, R., Chua, N-H.** (1993) Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J Mol Biol.* **230**: 1131 – 1144.
- Jackson, S., Gascón, J., Carrera, E., Monte, E., Prat, S.** (1997) Cloning and expression analysis of a gene that shows developmental regulation upon tuberization in potato. *Plant Mol Biol.* **33**: 169 – 174.
- Jacobsen, J. V., Close, T.** (1991) Control of transient expression of chimeric genes by

gibberellic acid and abscisic acid in protoplast prepared from matured barley aleurone layers. *Plant Mol Biol.* **16**: 713 – 724.

**Jaglo-Ottosen, K. R., Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Schabenberger, O., Thomashow, M. F.** (1998) *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science.* **280**: 104 – 106.

**Jaglo-Ottosen, K. R., Kleff, S., Amundsen, K. L., Zhang, X., Haake, V., Zhang, J. Z., Thomashow, M. F.** (2001) Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiol.* **127**: 910 – 917.

**Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotech.* **17**: 287 – 291.

**Kaye, C., Guy, C. L.** (1995) Perspectives of plant cold tolerance: physiology and molecular responses. *Sci Prog.* **78**: 271 – 299.

**Kazuoka, T., Oeda, K.** (1994) Purification and characterization of COR85-oligomeric complex from cold-acclimated spinach. *Plant Cell Physiol.* **35**: 601 – 611.

**Kempter, B., Lupp, P., Neumeier, D.** (1991) A short procedure for Southern blotting on neutral and anionic membranes. *Trends in Genetics.* **7**: 109 – 110.

**Kim, H. J., Kim, Y. K., Park, J. Y., Kim, J.** (2002) Light signalling mediated by phytochrome plays an important role in cold-induced gene expression through the C-repeat/dehydration responsive element (C/DRE) in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **29**: 693 – 704.

**Knight, H., Knight, M. R.** (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci.* **6**: 262 – 267.

**Krüger, C., Berkowitz, O., Stephan, U. W., Hell, R.** (2002) A metal-binding member of the late embryogenesis abundant protein family transports iron in the phloem of *Ricinus communis* L. *J Biol Chem.* **277** (28): 25062 – 25069.

**Laemmli, U. K.** (1970) Clavage of structural proteins during the assembling of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**: 680 - 685.

**Lee, T. M., Lur, H. S., Chu, C.** (1995) Abscisic acid and putrescine accumulation in chilling-tolerant rice cultivars. *Crop Sci.* **35**: 502 – 508.

- Leung, J. and Giraudat, J.** (1998) Abscisic acid signal transduction. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **49**: 199 – 222.
- Levitt, J.** (1980) Responses of plants to environmental stresses. In *Physiological Ecology*. Edited by T. T. Kozłowski. Academic press. Chapter 3.
- Loake, G. J., Faktor, O., Lamb, C. J., Dixon, R. A.** (1992) Combination of H-box (CCTACCN/CT) and G-box (CACGTG) cis elements is necessary for feed-forward stimulation of a chalcone synthase promoter by the phenylpropanoid-pathway intermediate p-coumaric acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 9230 - 9234.
- MacRobbie, E. A.** (1995) ABA-induced ion efflux in stomatal guard cells: multiple actions of ABA inside and outside the cell. *Plant J.* **7**: 565 – 576.
- McCubbin, W. D., and Kay, C. M.** (1985) Hydrodynamics and optical properties of the wheat Em protein. *Can J Biochem.* **63**: 803 – 810.
- McKendree, W. L., Jr, Ferl, R. J.** (1992) Functional elements of the *Arabidopsis* Adh promoter include the G-box. *Plant Mol Biol.* **19**: 859 – 862.
- Minet, M., Dufour, M-E, Lacroute, F.** (1992) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J.* **2**: 417 - 422.
- Moreno-Fonseca, L. P. And Covarrubias, A. A.** (2001) Downstream DNA sequences are required to modulate Pvlea-18 gene expression in response to dehydration. *Plant Mol Biol.* **45**: 501 – 515.
- Murashige, T., Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* **15**: 473 - 497.
- Ndong, C., Danyluk, J., Wilson, K. E., Pockock, T., Huner, N. P. A., Sarhan, F.** (2002) Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses. *Plant Physiol.* **129**: 1368 – 1381.
- Neill, S. J., Horgan, R., Walton, D. C., Lee, T. S.** (1982) The biosynthesis of abscisic acid in *Cercospora rosicola*. *Phytochemistry.* **21**: 61 – 65.
- Quiroz-Castañeda, R.E.** (2005) Determinación de la localización subcelular de la proteína PvLEA18 de frijol mediante la fusión con la proteína verde fluorescente. Tesis de Maestría. IBT-UNAM.
- Riechmann, J. L., Heard, J., Martin, G., Reuber, L., Jiang, C., Keddie, J., Adam, L., Pineda, O., Ratcliffe, O. J., Samaha, R. R. et al** (2000) *Arabidopsis* transcription factors:

genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science*. **290**: 2105 – 2110.

**Rock, C. D., Quatrano, R. S.** (1994) Plant regulators. Insensitivity is in the genes. *Curr Biol*. **4** (11): 1013 – 1015.

**Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.** (1989) *Molecular cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY. 7.37 - 7.52.

**Seki M, Narusaka M., Abe H, Kasuga, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Shinozaki, K.** (2001) Monitoring the expression pattern of 1,300 *Arabidopsis* genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray. *Plant Cell* **13**: 61–72

**Setter, T. L.** (1997) Role of the Phytohormone ABA in Drought Tolerance: Potential Utility as a Selection Tool. In *Stress Physiology and Identification of Secondary Traits*. Edited by. 142- 150.

**Shen, Q., Zhang, P., Ho, T. H-D.** (1996) Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: Composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA induction of gene expression in barley. *Plant Cell*. **8**: 1107 – 1119.

**Shih, M-D., Hoekstra, FA., Hsing Y-IC.** (2008) Late embryogenesis abundant proteins. *Adv Bot Rev*. **48**: 211-255

**Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (1996) Molecular responses to drought and cold stress. *Current Opinion in Biotechnology*. **7**: 161 – 167.

**Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (1997) Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol*. **115**: 327 – 334.

**Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology*. **3**: 217 – 223.

**Sivamani, E., Bahieldin, A., Wraithc, J. M., Al-Niemia, T., Dyer, W. E., Hod, T. H. D., Qu, R.** (2000) Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene. *Plant Sci*. **155**: 1 – 9.

**Skriver, K., Mundy, J.** (1990) Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell*. **2**: 503 – 512.

**Somerville, C. R. and Ogren, W. L.** (1982) Isolation of photorespiration mutants in

*Arabidopsis* Edelman, Hallick, R. B., Chua, N. H. eds, Methods in Chloroplast Biology. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.

**Steponkus, P. L., Uemura, M., Joseph, R. A., Gilmour, S. J., Thomashow, M. F.** (1998) Mode of action of the *COR15a* gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. Proc Natl Acad Sci USA. **95**: 14570 – 14575.

**Thomashow, M. F.** (1998) Role of cold-responsive genes in plant freezing tolerance. Plant Physiol. **118**: 1 – 7.

**Thomashow, M. F.** (1999) Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. Annu Rev Plant Biol. **50**: 571 – 599.

**Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.** (1979) Electroforetic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications Proc. Natl. Acad. Sci. **76**: 4350 - 4354.

**Tunnacliffe, T., Wise, M.J.** (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. Naturwissenschaften. **94**:791–812

**Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K.** (2000) *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. Proc. Natl. Acad. Sci USA. **97**: 11632 – 11637.

**Valvekens, D., Van Montagu, M., Van Lijsebettens, M.** (1988) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. Proc. Natl. Acad. Sci USA. **85**: 5536 - 5540.

**Van der Eycken, W., de Almeida, J., Inzé, D., Van Montagu, M., Gheysen, G.** (1996) A molecular study of root-knot nematode-induced feeding sites. Plant J. **9**: 45 – 54.

**VanToai, T. T., Saglio, P., Ricard, B., and Pradet, A.** (1995) Developmental regulation of anoxic stress tolerance in maize. Plant Cell and Environ. **18**: 937 – 942.

**Vierling, E., and Kimpel, J. A.** (1992) Plant responses to environmental stress. Current Opinion in Biotechnology. **3**: 164 – 170.

**Voetberg, G. S., Sharp, R. E.** (1991) Growth of the maize primary root at lower water potentials. Plant Physiol. **96**: 1125 – 1130.

**Wang, W. X., Vinocur, B., Shoseyov, O., Altman, A.** (2001a) Biotechnology of plant osmotic stress tolerance: physiological and molecular considerations. Acta Hort. **560**: 285 –

292.

**Weisshaar, B., Armstrong, G. A., Block, A., Da Costa e Silva, O., Hahlbrock, K.** (1991) Light-inducible and constitutively expressed DNA-binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *EMBO J.* **10**: 1777 – 1786.

**Westhoff, P., Jeske, H., Jürgens, G., Kloppstech, K., Link, G.** (1998) The genetic analysis of development processes – methodology. In *Molecular plant development from gene to plant*. Oxford University eds. Oxford, New York. Pag. 41.

**Wolkers, W. F., McCready, S., Brandt, W. F., Lindsey, G. G., Hoekstra, F. A.** (2001) Isolation and characterization of a D-7 LEA protein from pollen that stabilizes glasses in vitro. *Biochim Biophys Acta.* **1544**: 196 – 206.

**Xu, D., Duang, X., Wang, B., Hong, B., Ho, T.D.H., Wu, R.** (1996) Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiol.* **110**: 249 - 257.

**Yamaguchi-Shinozaki, K., 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.

**Yamaguchi-Shinozaki, K., 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.

**Yamamoto, K. T.** (1994) Further characterization of auxin-regulated mRNAs in hypocotyl sections of mung bean [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]: sequence homology to genes for fatty-acid desaturases and atypical late-embryogenesis-abundant protein, and the mode of expression of the mRNAs. *Planta.* **192**: 359 – 364.

Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, P. D., Somero, G. N. (1982) Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science.* **217**: 1214 – 1217.

**Ye, G. - N., Stone, D., Pang, S. - Z., Creely, W., González, K., Hinchee, M.** (1999) *Arabidopsis* ovule is target for *Agrobacterium in planta* vacuum infiltration transformation. *Plant J.* **19**: 249 - 257.

## VIII. PÁGINAS WEB

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> Base de datos del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI).

<http://www.tigr.org> The Institute for Genomic Research (TIGR)

<http://www.mips.gsf.de> Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS)

<http://www.arabidopsis.org/BLAST/>