



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Localización de la proteína LEA4-5 en *Arabidopsis thaliana*

Tesis que para obtener el título de Licenciada en Biología

Presenta

Coral Martínez Martínez

Directora de Tesis:
Dra. Alejandra A. Covarrubias Robles

México D.F. Mayo 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por apoyarme en todo momento durante mi carrera y la vida. Sin ellos no estaría en el lugar donde me encuentro ahora. ¡¡¡Los amo!!!

A mi hermano, por apoyarme durante mis desveladas y por alimentarme.

A mis amigos de la Facultad, por todo lo vivido durante la carrera.

A Yadira por encaminarme y apoyarme en el proyecto. Gracias por tus pláticas, tratos y consejos cuando recién llegué a Cuernavaca.

A mi tutora Alejandra, por apoyarme tanto académica como personalmente durante el camino de la tesis. ¡¡¡Te adoro Jefa!!!

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el proyecto 132258-Q y a DGAPA con el proyecto IN-206212.

INDICE

INTRODUCCIÓN

1. El estrés y las plantas	5
2. El déficit hídrico en las plantas	6
3. Respuesta de las plantas ante el estrés hídrico	7
I. Disminución del área de las hojas	10
II. Aumento en la extensión de la raíz	10
III. Cierre de estomas	11
IV. Limitaciones en la fotosíntesis	13
V. Ajuste osmótico	13
4. Redes de genes involucrados en la respuesta de estrés hídrico y la tolerancia en las plantas	14
I. Vía independiente de ABA	16
II. Vía dependiente de ABA	17
5. Proteínas involucradas en la respuesta al déficit hídrico.	18
1. Proteínas LEA	19

ANTECEDENTES

1. Grupo 4 en <i>Arabidopsis thaliana</i>	21
2. Importancia de la localización de las proteínas LEA en plantas	27

Modelo de estudio: Arabidopsis thaliana 29

HIPOTESIS Y OBJETIVOS 30

MATERIALES Y MÉTODOS 31

RESULTADOS

1. Establecimiento de las condiciones de crecimiento.	38
2. La proteína AtLEA4-5 se acumula en los tejidos de plantas sometidas a déficit hídrico	40

3. La proteína AtLEA4-5 se detecta en los tejidos sometidos a déficit hídrico	43
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	52
PERSPECTIVAS	53
ANEXO 1	54
BIBLIOGRAFIA	56

INTRODUCCIÓN

El estrés y las plantas

A lo largo del ciclo de vida de una planta, ésta se encuentra sometida a cambios físicos y químicos en el ambiente que pueden provocarle periodos de estrés (Nilsen y Orcutt, 1996). El estrés se define como cualquier factor externo que ejerce una influencia negativa en la planta limitando el funcionamiento óptimo de la misma. El estrés puede ser del tipo biótico, dada por organismos tales como hongos, bacterias, virus o plagas, o abiótico dado por factores ambientales como altas o bajas temperaturas, altas concentraciones de sal en el suelo y el déficit hídrico, entre otros. Sin embargo, también algunas actividades antropogénicas han acentuado la existencia de factores de estrés para las plantas.

Cualquier tipo de estrés en la planta puede limitar el crecimiento y la productividad de la misma. En el caso del estrés abiótico, éste no se da independientemente, si no que pueden interaccionar varios factores al mismo tiempo, por ejemplo, el estrés por temperatura está íntimamente asociado al estrés por limitación de agua. Por otro lado, existen varios factores ambientales que producen efectos similares, como lo son las bajas o altas temperaturas y la salinidad tienen como consecuencia la reducción en la disponibilidad de agua. También es bien sabido que una alta concentración de solutos disueltos en la zona de la raíz reduce el potencial de agua del suelo, provocando déficit hídrico y que las bajas temperaturas provocan la congelación lenta del tejido formando hielo extracelular, limitando la disponibilidad de agua. En consecuencia diferentes condiciones ambientales adversas comparten estímulos físicos comunes que, por tanto, pueden inducir respuestas similares en los organismos.

Actualmente, el estrés abiótico es la causa principal de la pérdida de millones de cultivos al año, amenazando la sostenibilidad de la industria agrícola (Mahajan y Tuteja, 2005). En

los últimos años la producción de cultivos se ha visto perjudicada por la disminución de tierras cultivables debido a la ocupación humana y a la degradación del suelo. La producción agrícola también se ha visto comprometida por una mayor incidencia de fenómenos climáticos graves debidos al calentamiento global. Esto ha provocado un déficit de alimentos que, desafortunadamente, en los últimos años se ha aunado a una mayor demanda debido al aumento de la población humana, a las costumbres alimenticias de las regiones más poderosas económicamente y a las políticas económicas dominantes, entre otras razones (Pareek et al., 2010). Por eso, para poder satisfacer las necesidades humanas, es necesario abundar en el estudio de la mejora de la tolerancia al estrés abiótico y el rendimiento de los cultivos.

El déficit hídrico en las plantas

De los cuatro factores físicos en el suelo que afectan el crecimiento y la productividad de la planta (impedimento mecánico, agua, aireación y temperatura), el agua es una de las más importantes (Kirkham, 2005). El agua en las plantas constituye del 70 al 95% de la masa de los tejidos y desempeña funciones fundamentales para la vida no sólo en las plantas sino en general en todos los organismos.

El estrés por déficit hídrico se produce en las plantas en respuesta a un ambiente escaso en agua, en donde la tasa de transpiración excede a la toma de agua. El déficit hídrico no sólo ocurre cuando hay poca agua en el ambiente, sino también por bajas temperaturas o por una elevada salinidad del suelo. Estas condiciones, capaces de inducir una disminución del agua disponible en el citoplasma de las células, también se conocen como estrés osmótico. El estrés hídrico más frecuente es el causado por la falta de disponibilidad de agua en el suelo provocado por la sequía. La sequía es la ausencia de lluvias o precipitaciones en un periodo determinado y un área geográfica dada, donde el agua no es suficiente para abastecer las necesidades de las plantas, los animales y en algunos

casos de las poblaciones humanas y, actualmente, ésta es una de las principales causas de la baja en la producción de los cultivos (Kirkham 2005; Moreno 2009).

En la célula, el agua permite el transporte intra e intercelular, la difusión de moléculas grandes y pequeñas e influye en la estructura y en la estabilidad de éstas. Teniendo en cuenta la gran importancia del agua en las plantas, se puede considerar que una cantidad limitada o excesiva de agua constituye un factor adverso o estresante e inductor de daños y reacciones en los seres vivos. El impacto negativo de esta condición de estrés se refleja en los daños que genera en la estructura de las células, al provocar el desplazamiento de las proteínas de membrana, lo cual contribuye a la pérdida de la integridad de la membrana misma y de la selectividad, así como una pérdida de la compartimentalización celular y de las actividades enzimáticas. (Mahajan y Tuteja, 2005). Además, algunas proteínas citosólicas y organelos pueden disminuir su actividad o, bajo condiciones muy severas, sufrir desnaturalización. La alta concentración que se puede alcanzar de los electrolitos o iones celulares, debido a la deshidratación del protoplasma, también puede causar trastornos en proteínas, ácidos nucleicos y, en consecuencia, en el metabolismo celular (Mahajan y Tuteja, 2005).

Respuesta de las plantas ante el déficit hídrico

Ante el estrés, las plantas presentan una serie de cambios morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y moleculares (Bhatnagar-Mathur et al., 2008). Cuando se habla de mecanismo de respuesta de las plantas ante el estrés hídrico, se tiene que tomar en cuenta que dependiendo de la especie y estado de desarrollo en el que se encuentre, éstas pueden responder de manera diferente ante la misma condición. Con estos factores, la intensidad de la respuesta puede variar tanto en tiempo como en espacio, siendo diferente en órganos de la misma planta (Fig. 1).

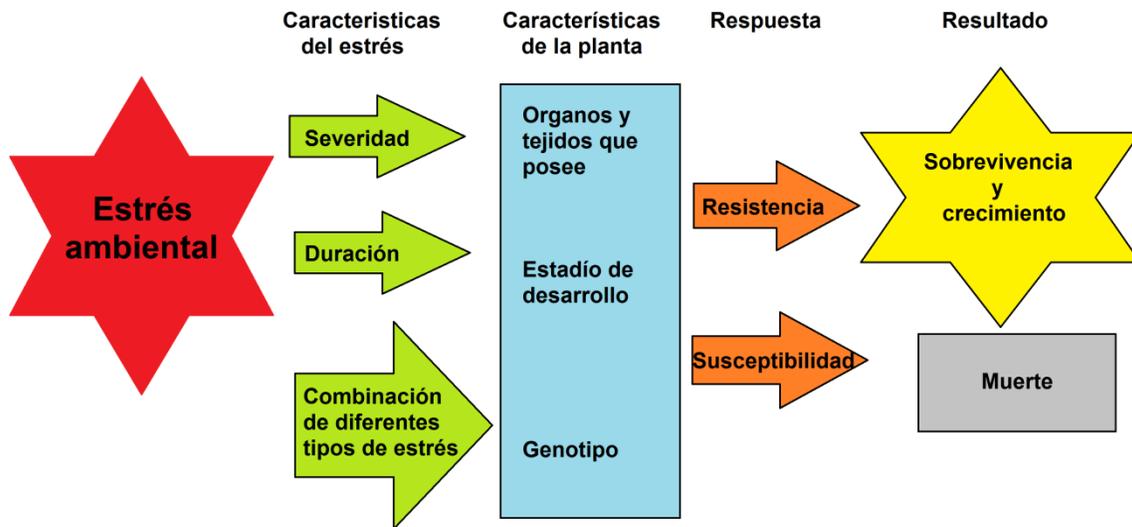


Fig. 1 Factores que determinan cómo las plantas responden ante un estrés ambiental

En el curso de la evolución, las plantas han desarrollado diferentes mecanismos ante el déficit hídrico. Los mecanismos para la resistencia ante el déficit hídrico se pueden dividir en diferentes tipos. Primero, podemos discernir entre el aplazamiento de la desecación, la cual se refiere a la capacidad de los tejidos para mantenerse hidratados, y la tolerancia a la desecación, la capacidad de la planta de seguir funcionando ante la deshidratación. Otro mecanismo es el escape al déficit hídrico, en el cual las plantas se encuentran comprometidas a completar su ciclo de vida durante periodos donde el agua se encuentra disponible (Taiz y Zeiger, 1991). Si se altera el metabolismo, la selección favorecerá genotipos con menor desestabilización metabólica. La sensibilidad de las especies de plantas hacia los factores de estrés puede provocar su extinción o cambios en la comunidad vegetal.

Debido a la importancia que tiene el agua en el metabolismo de las plantas, el déficit de agua afecta rápidamente los procesos que van desde la fotosíntesis hasta la respiración. De acuerdo a los requerimientos de agua, las plantas pueden ser consideradas como hidrófitas, si están adaptadas a vivir total o parcialmente sumergidas en el agua;

mesófitas, si están adaptadas a un aporte moderado de agua; y xerófitas si están adaptadas a ambientes áridos (Nilsen y Orcutt, 1996).

Las plantas han respondido al estrés hídrico desarrollando adaptaciones tanto a nivel morfológico como anatómico y celular, que les permiten vivir en condiciones de constante estrés hídrico. Entre las plantas tolerantes se encuentran aquéllas que evitan la deshidratación utilizando mecanismos morfo-fisiológicos complejos como hojas pequeñas y cerosas; estructuras que facilitan la captación del rocío o bien, raíces muy profundas, reducción del número y tamaño de los estomas, modificación de la estructura del dosel, cambios anatómicos en la epidermis, cutículas gruesas y cerosas en combinación con tejidos suculentos y metabolismos ácido de las crasuláceas (CAM) que les permiten explotar ambientes áridos (Moreno, 2009; Taiz y Zeiger, 1991).

Cuando las plantas detectan la falta de agua en el suelo cierran los estomas y detienen el proceso de la fotosíntesis. Las plantas con metabolismo C4 consiguen superar la eficacia de la fotosíntesis con poca cantidad de CO₂, en condiciones donde el agua está poco disponible. En el metabolismo C4 hay una separación física entre el proceso de asimilación de CO₂, que se produce en células del mesófilo, y la reducción de éste a carbohidratos en las células de la vaina perivascular. La ventaja de este proceso radica en el hecho de que al estar la RuBisCO (ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa) sólo en las células de la vaina, se impide que reaccione con oxígeno en situaciones en las cuales la concentración de CO₂ sea muy baja, reduciendo considerablemente la pérdida de energía y de CO₂ a través de la fotorrespiración (Taiz y Zeiger 1991).

En el caso de las plantas con metabolismo CAM, se permite la fijación nocturna de CO₂ y fotoprotección como resultado de las altas concentraciones intracelulares de CO₂ generadas por la descarboxilación de malato durante el día, cuando los estomas están cerrados. Como en el metabolismo C4, el metabolismo CAM suprime la fotorrespiración

umentando la eficiencia de la fotosíntesis a temperaturas elevadas en comparación con las plantas C3 (Taiz y Zeiger, 1991)

- *Disminución del área de las hojas*

El área foliar en la planta es importante porque de ella depende la fotosíntesis y una rápida expansión foliar puede afectar negativamente la adaptación a la poca disponibilidad de agua (Moreno, 2009). Debido a que el contenido de agua disponible disminuye, también el volumen celular se reduce provocando una disminución en la presión hidrostática o turgor. Si la pérdida de agua se agrava y las células se contraen más, la concentración de solutos aumenta, la membrana plasmática se vuelve más gruesa y se comprime más, lo que deja un menor espacio en la célula. Debido a que la pérdida en la turgencia es el primer evento significativo, el área de la hoja y la transpiración disminuyen, para evitar una mayor pérdida de agua. Esto se considera como una de las primeras reacciones para defenderse contra el déficit hídrico (Taiz y Zeiger, 1991)

- *Aumento en la extensión de la raíz*

Las relaciones entre la parte aérea y la raíz dependen de un equilibrio funcional entre la absorción de agua por la raíz y la fotosíntesis y la transpiración que se llevan a cabo en la parte aérea. Este equilibrio se modifica cuando la disponibilidad de agua disminuye. El déficit hídrico afecta el desarrollo de la raíz, ya que existe una relación entre el agua disponible en la tierra y el tamaño que puede alcanzar la raíz. El desarrollo de la raíz se afecta en menor grado que el de la parte aérea, la cual disminuye su velocidad de crecimiento por causa del estrés, de tal forma que las raíces continúan su crecimiento y desarrollo en búsqueda de agua hacia zonas más profundas del suelo. Este crecimiento del sistema radicular es una segunda línea de defensa contra la sequía y varía dependiendo de la especie vegetal así como de la severidad del estrés (Nilsen y Orcutt, 1996).

- *Cierre de estomas*

Cuando la planta se enfrenta ante una limitación de agua, sus hojas son capaces de responder rápidamente y proteger a la planta de una deshidratación inminente. Las células de la epidermis modificadas conocidas como células guarda, forman un orificio conocido como estoma, cuya apertura se modula por diferentes estímulos ambientales como la intensidad luminosa, los niveles de CO₂ y la disponibilidad de agua en el ambiente (atmósfera), entre otros. Esta última condición induce un cerrado de los estomas, así como una inhibición de su apertura, para con ello evitar la pérdida de agua (Fig. 2).

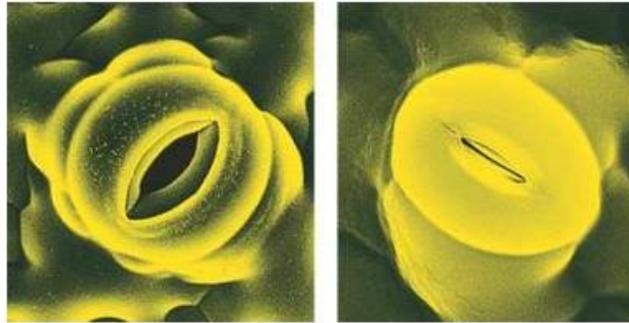


Fig 2. Estomas. Estos se pueden abrir (izquierda) o cerrar (derecha) para controlar el movimiento de dióxido de carbono, oxígeno y vapor de agua. Tomada de la web: djackson.myweb.uga.edu/4430/Daily/Handouts/photosynthesisText.html.

Es posible distinguir dos fases del cierre estomático en condiciones de déficit hídrico:

- **Cierre hidropasivo.** Esto ocurre en la etapa inicial donde no interviene ningún proceso fisiológico, sino que se debe a un proceso físico. El aire muy seco provoca pérdidas muy rápidas de agua en la epidermis, lo que hace que disminuya el contenido hídrico relativo de la hoja y de las células oclusivas, provocando el cierre estomático.
- **Cierre hidroactivo.** Esto se lleva a cabo en una etapa donde la planta se ve sometida a un mayor grado de deshidratación. Aquí se ven implicados procesos fisiológicos, donde la disminución en la concentración de solutos en las células oclusivas implica un aumento en el potencial hídrico del interior celular, saliendo

agua al exterior, produciendo el cierre estomático, y procesos metabólicos, donde se produce una redistribución diferencial de la fitohormona ácido abscísico (ABA) en las células del mesófilo. Las células guarda presentan unos receptores que detectan el ABA y comienzan una cascada de señalización que culmina con el cierre estomático. El cierre estomático implica un impedimento en la entrada de CO_2 , al igual que evita la pérdida de agua por transpiración (Taiz y Zeiger, 1991).

El ABA es una hormona que se caracteriza principalmente por producirse bajo condiciones de déficit hídrico y juega un papel esencial en la respuesta de las plantas a la sequía y a las altas concentraciones de sal. Además, participa de manera importante en los procesos de apertura y cierre de los estomas, por lo que se puede generar una cierta tolerancia ante la limitación de agua. Estos fenotipos se acompañan por la inducción de genes implicados en el cerrado de estomas y de respuesta a estrés (Sauter et al., 2001; Cutler et al., 2010). ABA juega un papel importante en la regulación de la apertura de los estomas. Éste se sintetiza en las células del mesófilo y cuando estas células sufren déficit hídrico ocurren dos procesos: primero, el ABA producido en las células del mesófilo se libera al apoplasto haciendo posible que el flujo de la transpiración lo dirija hacia las células guarda; también se incrementa la síntesis de ABA, pero el ya sintetizado se acumula en los cloroplastos, de tal forma que ante una disminución en el agua disponible, se libera de este organelo para pasar al citosol en donde actúa como un mensajero que regula diferentes canales iónicos, tales como el de K^+ , que es activado e induce la salida de este catión a la célula para con ello promover la salida de agua, disminuir el turgor de las células guarda, y con ello provocar el cerrado del estoma. La redistribución de ABA en la célula depende del pH intracelular y de la propiedad del ABA de transportarse a través de las membranas como anión pero no como catión (Taiz y Zeiger 1991).

- *Limitaciones en la fotosíntesis*

La fotosíntesis, junto con el crecimiento celular, es uno de los procesos primarios que se ven afectados por el déficit hídrico o la salinidad. Los efectos pueden ser directos, como la disminución de la disponibilidad de CO₂ causada por limitaciones en la difusión a través de los estomas y el mesófilo o las alteraciones del metabolismo fotosintético donde pueden surgir efectos secundarios como el estrés oxidativo. Este último en su mayoría se presenta bajo múltiples condiciones de estrés y puede afectar seriamente a la maquinaria fotosintética de la hoja. Estos efectos variarán según la intensidad y la duración del estrés, así como de acuerdo a la edad de la hoja (hojas con más edad se ven más afectadas) y a la especie de la planta (Chaves et al., 2009).

Durante las primeras etapas del estrés hídrico, el cierre de los estomas provoca que aumente la eficiencia del uso del agua. La fotosíntesis es menos sensible que otros procesos al estrés hídrico, de modo que raramente la tasa fotosintética de la hoja se ve afectada durante un déficit hídrico leve; sin embargo, durante un estrés hídrico severo, se ve disminuida la tasa fotosintética de la planta a causa de la poca disponibilidad de CO₂. Debido a esto disminuye la actividad de carboxilación de la enzima RuBisCo y aumenta la de oxigenasa. Se ve limitada la entrada del CO₂, pero el O₂ se acumula, debido a que no puede ser liberado porque los estomas se encuentran cerrados. También se ve una reducción en la tasa de transporte de electrones y en la síntesis de NADPH, lo cual repercute en la producción de ATP. Además se presentan altas concentraciones de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden dañar a la ATP sintasa (Chaves et al., 2009; Pinheiro y Chaves, 2011).

- *Ajuste osmótico*

A nivel celular, otra respuesta que le permite a la planta contender con esta situación adversa es el ajuste ósmótico, que consiste en una disminución del potencial hídrico en los

tejidos, lo cual tiene como consecuencia inmediata la entrada de agua y, por tanto, evita una disminución en el turgor de los tejidos al mantener el estatus hídrico de las células y, con ello, el funcionamiento de diversos procesos críticos para continuar, aunque a una tasa menor, con su crecimiento y desarrollo. 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^+ . La acumulación de iones durante el ajuste osmótico ocurre principalmente en la vacuola, mientras que en el citoplasma se acumulan solutos. Los solutos que comúnmente se acumulan en las plantas dependen de la especie; sin embargo, todos ellos se caracterizan por tener una alta solubilidad y no ser tóxicos a la célula, por lo que se les conoce como osmolitos compatibles. Entre los compuestos que poseen estas propiedades están los polioles (azúcares), metilaminas, aminoácidos libres y derivados de ciertos aminoácidos. Estas características fisicoquímicas les da la capacidad de proteger a macromoléculas (e.g. proteínas) y estructuras celulares (e.g. membranas) (Moreno, 2009). Como se puede apreciar, una consecuencia metabólica y fisiológica del ajuste osmótico es que la planta que lo realice invertirá una proporción significativa de sus esqueletos de carbono en la síntesis de los osmolitos necesarios para ello, a costa de la eficiencia en otros procesos como pudiera ser la misma fotosíntesis; de tal forma, que el momento durante el desarrollo de la planta en la cual este proceso realmente tendría un impacto en la producción sería durante la etapa juvenil o adulta pero antes de la etapa reproductiva, dado que en esta última los esqueletos de carbono resultan de gran importancia para la formación y llenado de las semillas.

Redes de genes involucrados en la respuesta y tolerancia al déficit hídrico en las plantas

Además de que el estrés por déficit hídrico induce una serie de cambios a nivel fisiológico también se lleva a cabo una respuesta a nivel celular y molecular. Estas respuestas están íntimamente relacionadas, algunas de ellas son consecuencia de la acumulación o reducción de los niveles de ciertas proteínas o de su actividad, lo cual a su vez dependerá de la inducción o represión de la expresión genética, de la estabilidad de sus RNA

mensajeros o de la eficiencia de la traducción de los mismos, o bien de la activación o inhibición de su actividad, etcétera. A pesar de que existe evidencia de una regulación a diferentes niveles, la alta proporción de transcritos cuyos niveles se modifican en respuesta a estas condiciones de estrés ha llevado a sugerir que la respuesta a déficit hídrico se modula mayoritariamente a nivel transcripcional (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007).

Durante la respuesta de la planta, se ha visto que la hormona ABA actúa como un mensajero entre el estímulo estresante y la respuesta a nivel molecular. Sin embargo, también se han detectado genes implicados en la respuesta de las plantas al déficit hídrico cuya expresión no se induce por el ABA, lo que indica que esta respuesta puede ser dependiente y/o independiente del ABA (Fig.3). A la fecha, gracias al estudio de perfiles génicos mediante el uso de cDNA y microarreglos, se conocen una gran cantidad de genes cuya expresión se afecta por esta condición de estrés, de forma dependiente o independiente de ABA, a través de elementos que actúan en *cis* o en *trans* en sus regiones regulatorias (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006; Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007; Huang et al., 2012)

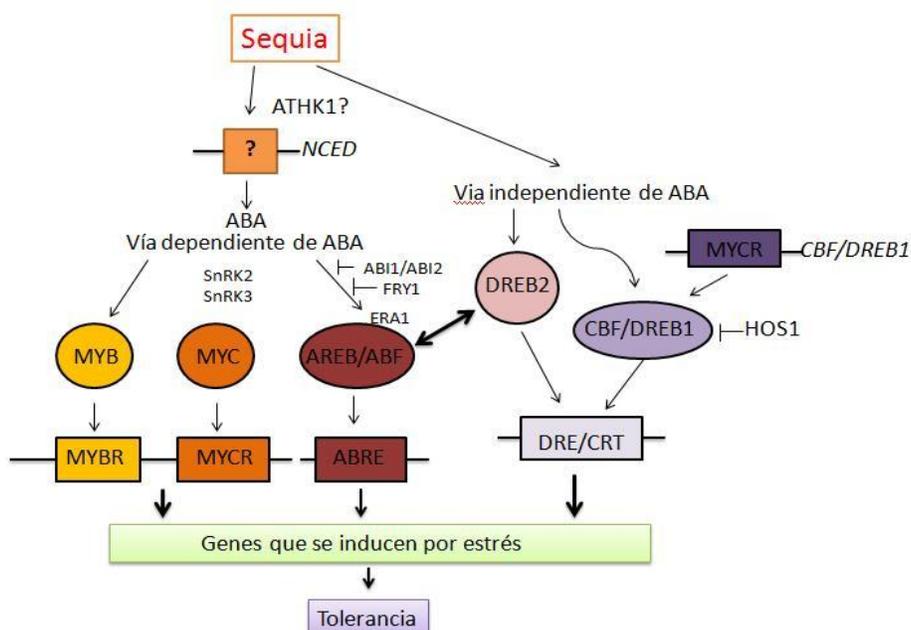


Fig. 3. Vías dependiente e independiente de ABA en sequía. Adaptado de Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006.

El producto de los genes inducidos por el déficit hídrico puede ser clasificado en dos grupos. El primer grupo incluye a proteínas reguladoras como serían los factores de transcripción involucrados en modular la expresión genética tras recibir la señal a través de proteínas como cinasas, fosfatasas, proteínas involucradas en el metabolismo de fosfolípidos, entre otras. El segundo grupo incluye a aquellas proteínas efectoras que funcionan durante el estrés como chaperonas, proteínas protectoras como las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant), proteínas de unión a mRNA, proteínas involucradas en el transporte de carbohidratos y de agua, enzimas detoxificantes, inhibidores de proteasas o proteínas involucradas en la transferencia de lípidos, entre otras muchas (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2006).

- *Vía independiente de ABA*

Existe una gran variedad de genes que se regulan por esta vía. Un ejemplo es el gen *RD29A/COR78/LTI78* de *Arabidopsis* que se induce por sequía, en frío y ABA. Sin embargo, este gen también se induce en mutantes *abi* (insensibles al ABA) en sequía y en frío. Los análisis del promotor de este gen muestran una secuencia conservada de 9 pb (TACCGACAT), denominada DRE (elemento de respuesta a deshidratación), que actúa como un elemento en *cis* que se demostró ser esencial para que un gen determinado se active por déficit hídrico de manera independiente del ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Por lo tanto, el elemento DRE se ha encontrado en las regiones promotoras de otros muchos genes inducidos por sequía, salinidad o frío. Los factores transcripcionales responsables de este tipo de activación se unen a los elementos DRE y se ha encontrado que pertenecen a la familia de factores de transcripción llamada ERF/AP2, la cual comparte un dominio conservado con otros factores transcripcionales tipo AP2, como aquéllos que regulan el desarrollo de la flor. A la fecha, se han identificado varios factores de este tipo que se han clasificado como CBF/DREB1 y DREB2. Ambos factores se unen a los elementos DRE/CRT; sin embargo, los factores DREB1/CBF se activan en condiciones de frío mientras que el factor DREB2 está implicado en la expresión de genes de respuesta a sequía, lo que indica que son capaces de discriminar a sus genes blanco por

su interacción con otras proteínas reguladoras, antes o durante su unión a la región promotora de los mismos (Huang et al., 2012).

- *Vía dependiente de ABA*

El ABA regula varios aspectos del desarrollo de la planta, incluyendo la tolerancia a la desecación de semillas y la latencia de las mismas, desempeñando un papel crucial en la planta ante la respuesta al estrés abiótico (sequía, salinidad, frío e hipoxia). El análisis en mutantes afectadas en la síntesis del ABA (*aba3* y *aba1*) de *Arabidopsis* muestran que ABA juega un papel central en la respuesta de las plantas al estrés osmótico, ya que estas mutantes muestran fenotipos de sensibilidad a estas condiciones de estrés. Adicionalmente, la expresión de genes de respuesta a estrés, tales como *RD29A*, *rd22*, *COR15A*, *COR47* y *P5CS*, se ve severamente reducida o completamente bloqueada en estas mutantes. Ahora sabemos que existe una gran cantidad de genes cuyos niveles de expresión están mediados por ABA y, que esta regulación requiere de otros elementos que definen los niveles, el momento y el lugar para que la activación o la represión de un gen determinado se lleve a cabo (Narusaka et al., 2003).

La mayoría de los genes que responden al ABA presentan en su región promotora un elemento denominado ABRE (elemento de respuesta a ABA) con la secuencia ACGTGG/TC; sin embargo, uno solo de estos elementos no es suficiente para que la activación por esta hormona ocurra. Por ejemplo, el gen *RD29B* cuya activación depende del ABA, ya que mutantes insensibles a esta hormona (*abi1*) no lo expresan, requiere para su activación dos motivos ABRE en su promotor (Uno et al., 2000).

Aunque el elemento ABRE parece ser el que prevalece en los genes regulados por ABA, existen otros elementos *cis* que también reciben la señalización mediada por esta hormona. Tal es el caso de los elementos MYC y MYB, los cuales unen a los factores transcripcionales de donde proviene su nombre (MYC y MYB). La síntesis de estos factores

a su vez depende de la presencia del ABA, lo que sugiere que su participación ocurre en una segunda etapa de la respuesta. Los elementos de unión para estos factores transcripcionales se han identificado en genes que poseen también elementos ABRE, lo que indica que en algunos existe algún fenómeno de cooperatividad entre estos factores transcripcionales y/o que los genes de respuesta pasan por más de una etapa de inducción, quizás para reforzar la respuesta de la planta ante ciertas condiciones. Cabe mencionar que la función de estos factores en la respuesta de las plantas al estrés y al ABA se ve apoyada por observaciones como el que la sobre-expresión de AtMYC2 y AtMYB2 no sólo dan un fenotipo hipersensible a ABA sino que también mejoran la tolerancia al estrés osmótico (Pareek et al., 2010).

Proteínas involucradas en la respuesta al déficit hídrico.

Existen macromoléculas cuya abundancia correlaciona con la contención del estrés en las plantas; este es el caso de cierto grupo de proteínas que se acumulan abundantemente en la fase tardía de la embriogénesis, cuando la semilla entra en el proceso de pérdida de agua, una etapa obligada en el desarrollo de las semillas ortodoxas, sin la cual el embrión es incapaz de germinar y, por tanto, generar individuos viables. A este grupo de proteínas se les ha llamado proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (o proteínas LEA, del inglés Late Embryogenesis Abundant). Estas proteínas fueron descubiertas en semillas de algodón; sin embargo, también se han encontrado en otras semillas y tejidos vegetativos de plantas en condiciones de estrés (Hand et al., 2011). En general, son proteínas pequeñas como es el caso de las proteínas pequeñas de choque térmico (o small Heat Shock Proteins, sHSPs) como Hsp26, Hsp21 y Hsp22. Otras son proteínas globulares, algunas de almacenamiento y otras de función aún desconocida, para las que se ha propuesto un papel protector. Otro grupo más lo conforman las proteínas LEA típicas que presentan como característica sobresaliente su alto contenido en aminoácidos cargados e hidrofílicos, lo que les confiere una elevada flexibilidad estructural que promueve su despliegue en solución acuosa. Muchas de estas proteínas LEA no sólo se acumulan

durante la desecación de la semilla en la embriogénesis tardía, sino también en tejidos vegetativos cuando la planta se somete a condiciones de limitación de agua, lo que ha motivado se les considere importantes en la tolerancia de las plantas a estas condiciones de estrés (Wise, 2003).

- *Proteínas LEA (proteínas abundantes de la embriogénesis tardía)*

Las proteínas LEA típicas son proteínas que originalmente fueron identificadas en plantas (Dure y Galau 1981); sin embargo, actualmente se han identificado algunas proteínas similares en organismos pertenecientes a otros dominios taxonómicos en donde también se les ha encontrado asociadas a condiciones de estrés (Hand et al., 2011). Como se mencionó antes, estas proteínas presentan propiedades fisicoquímicas que las distinguen de la mayor parte de las proteínas, como su elevada hidrofiliidad y un alto contenido de aminoácidos pequeños, particularmente, glicina pero también serina o alanina. Estas características las incluyen en un grupo más amplio de proteínas denominadas 'hidrofilinas', cuya abundancia se relaciona de manera notablemente cercana con condiciones de déficit hídrico en cualquier organismo en donde se presenten. Las hidrofilinas presentan una amplia distribución y se han descrito en todos los dominios de la vida, desde procariotas y arqueas hasta animales. Aunque las hidrofilinas comparten propiedades fisicoquímicas, no necesariamente presentan similitud de secuencia entre ellas; ésto ocurre en ciertos sub-grupos, como sucede para algunas proteínas LEA de los grupo 1 y 3 (Tabla 1). Aunque su función *in vivo* se desconoce, existe evidencia que indica que se encuentran involucradas en la tolerancia a la desecación; por otro lado, datos adicionales han identificado funciones protectoras sobre proteínas y, en algunos casos, sobre membranas, también se ha sugerido que pueden actuar como secuestradoras de iones, o como asistentes en el plegamiento de otras proteínas cuando la célula se encuentra bajo condiciones de escasez de agua (Olvera-Carrillo et al., 2010; Battaglia et al., 2008).

Si bien existen varias clasificaciones, en este trabajo se seguirá la propuesta por Battaglia y col en 2008, en la cual las proteínas LEA se clasifican en siete grupos sobre la base de similitud de secuencia. El análisis de las secuencias en estos grupos muestra motivos distintivos dentro de los grupos. El número de miembros es diferente para cada grupo de proteínas LEA y varía en función de la especie de plantas (Olvera-Carrillo et al., 2010).

Tabla 1. Los siete grupos de proteínas LEA y sus características más significativas.

Grupo	Características
1 (D-19)	Representado principalmente por las proteínas D-19 y D-132 en semillas de algodón. Contienen una gran proporción de residuos cargados y un alto contenido de glicinas (18%). Se predice que pueden formar una estructura desordenada tipo <i>random coil</i> . En plantas, éstas se acumulan principalmente durante la embriogénesis en el período de desecación de la semilla y en órganos bajo deshidratación como el polen.
2 (D-11)	A las proteínas en este grupo también se les conoce como dehidrinas. Fue identificado originalmente como el grupo D-11 en embriones de algodón. Son altamente hidrofílicas y contienen una gran cantidad de aminoácidos cargados o polares. Poseen un motivo conservado de 15 residuos, rico en lisinas denominado el segmento K.
3 (D-7/D-29)	Se caracterizan por tener un motivo de 11 aminoácidos. Existen muchas diferencias en el peso molecular de los miembros de esta familia debido a que este motivo se puede encontrar repetido varias veces. Además se encuentran otros motivos conservados en el subgrupo D-7 (1,2 y 4) y el motivo 5 en el subgrupo D-29. Se ha predicho que el motivo de 11 aminoácidos forma una estructura de α -hélice anfipática.
4 (D-113)	Se encuentra en el reino de las plantas incluyendo a las briofitas y las plantas vasculares. Se encuentra conservada en su porción N-terminal, la cual abarca de 70 a 80 aminoácidos formando una α -hélice anfipática, mientras que la porción C-terminal es variable en cuanto a tamaño formando estructuras tipo <i>random coil</i> . Se dividen en dos sub-grupos debido a la ausencia del motivo 4 ó 5.
5 Hidrofóbicas o atípicas.	Contienen un alto porcentaje de residuos hidrofóbicos.
6 (PvLEA 18)	Grupo que surgió tras el descubrimiento de la proteína LEA 18 en <i>Phaseolus vulgaris</i> . Se han identificado 36 miembros de esta familia en diferentes especies de plantas vasculares. Se

	caracterizan por su tamaño pequeño (7-14 kDa) y su alta conservación. Se observan cuatro motivos, de los cuales el motivo 1 y 2 se encuentran altamente conservados.
7 (ASR1)	Este grupo incluye las proteínas denominadas ASR ya que éstas cumplen con todas las características fisicoquímicas y de acumulación que son comunes a las proteínas LEA típicas. Se acumulan en semilla seca y bajo condiciones de déficit hídrico. Se han identificado muchos genes <i>ASR</i> en monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas como <i>Pinus taeda</i> y <i>Gynkgo biloba</i> . Poseen tres motivos altamente conservados (1, 2 y 3). El motivo 3 se encuentra en la región C-terminal, en donde se detectó un motivo putativo de localización nuclear.

Los nombres entre paréntesis corresponden a los originalmente asignados por Dure et al. (1989), o bien, los que se asignaron a las proteínas que inauguraron al grupo correspondiente (Battaglia et al., (2008).

ANTECEDENTES

Proteínas LEA del grupo 4 en *Arabidopsis thaliana*

El presente trabajo se llevó a cabo con una de las proteínas pertenecientes al grupo 4 en *A. Thaliana*, cuya caracterización inicial fue reportada por Olvera-Carrillo (2010). Este grupo se caracteriza por ser uno de los más pequeños dentro de *A. thaliana* con sólo 3 miembros identificados (Tabla 2). Tiene un alto contenido de alanina, de treonina y de glicina, y se predice que en su dominio N-terminal (en las posiciones 70-80) puede formar α -hélices, en tanto que en el dominio C-terminal, de longitud variable, se predice una estructura desordenada o “random coil”.

Tabla 2. Características generales de los miembros que componen a la familia 4 de *A. thaliana*

Miembros	Generalidades				Estructura (predicha)
	aa	PM (kDa)	Pi	Cromosoma	
AtLEA 4-1	134	14.9	8.95	1	
AtLEa 4-2	97	10.5	9.67	2	
AtLEA 4-5	158	16.2	9.45	5	

En el trabajo de Olvera-Carrillo et al. (2010) se llevó a cabo un análisis funcional en donde se realizó la caracterización fenotípica de plantas bajo condiciones de limitación de agua que eran mutantes por pérdida de función y, por otro lado, sobre-expresoras de uno de los genes de esta familia (*AtLEA4-5*). Así mismo, se caracterizaron los patrones de acumulación del transcrito para cada uno de los genes de este grupo, bajo diferentes condiciones de estrés y en distintas etapas del desarrollo de la planta. Los resultados mostraron que los tres transcritos se acumulan diferencialmente durante el desarrollo de la semilla y que se encuentran en niveles similares en la semilla seca. En los tres casos, los transcritos sólo permanecen durante la imbibición de la semilla y durante las primeras horas de la germinación en condiciones óptimas para disminuir progresivamente a lo largo del desarrollo de la plántula. En el caso de los niveles de proteína, las tres se acumulan abundantemente en la semilla seca, aunque las proteínas *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2* claramente están también presentes a lo largo del desarrollo de la semilla, durante varios días después de la germinación y durante el desarrollo de la plántula, a diferencia de la *AtLEA4-5* que sólo se detecta en la etapa tardía de la embriogénesis y disminuye rápidamente durante la germinación (Olvera-Carrillo et al., 2010a; Fig. 4 A y B). Los tres transcritos y las proteínas presentan una elevada acumulación en respuesta a tratamientos de déficit hídrico inducido con polietilenglicol (PEG), siendo el mayor nivel el correspondiente al transcrito y a la proteína del gen *AtLEA4-5* (Fig. 5 A y B). Aunque el transcrito para la *AtLEA4-5* mostró mayor acumulación bajo tratamientos salinos, los

niveles de proteína en esta condición fueron similares para las tres proteínas (Fig. 5 A y B). El único transcrito y proteína que mostraron respuesta al tratamiento con 100 μ M de ABA fueron los correspondientes a la AtLEA4-5 (Fig. 5 A y B, Olvera-Carrillo et al., 2010a).

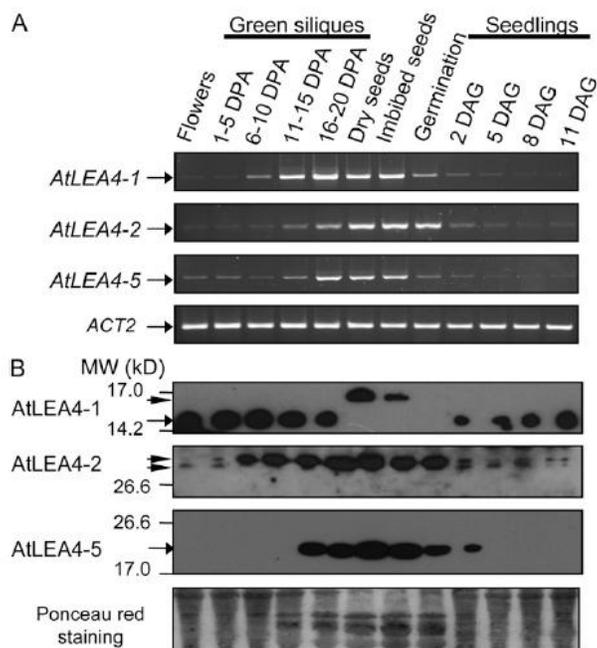


Fig. 4 Patrones de expresión de la familia LEA 4 en *A. thaliana* a nivel de transcrito (A) y a nivel de proteína (B) durante la embriogénesis, germinación y establecimiento de la plántula. Tomado de Olvera-Carrillo et al. (2010a).

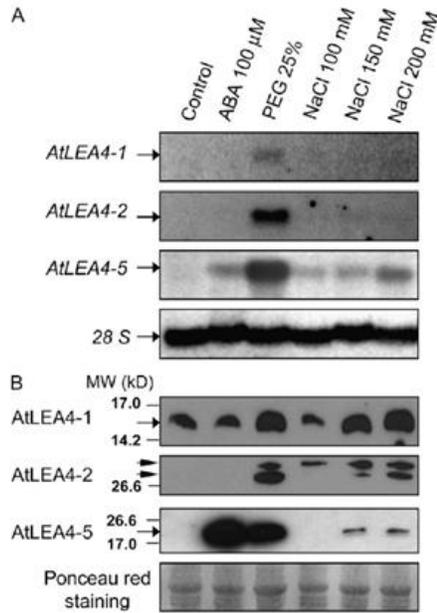


Fig. 5 Patrones de expresión a nivel de transcrito (A) y proteína (B) de la familia LEA 4 en *A. thaliana* en plántulas sometidas a tratamientos con ABA y estrés abiótico. Tomado de Olvera-Carrillo et al. (2010a).

Como se puede observar en las Figuras 4 y 5, las proteínas AtLEA4-1 y AtLEA4-2 muestran un patrón particular en cuanto a su migración en la electroforesis. En la semilla seca la AtLEA4-1 migra con una masa molecular mayor a la que presenta en cualquiera de las otras condiciones, sugiriendo una modificación post-traduccional, en tanto que para la AtLEA4-2 se detectan dos bandas con una masa molecular similar, cuyos niveles varían diferencialmente. Por ejemplo, bajo tratamientos con PEG resulta más abundante la forma de mayor migración electroforética y, en condiciones de salinidad, la de mayor abundancia es la que presenta una menor migración electroforética. Nuevamente, estas diferencias en migración pudieran ser el resultado de algún tipo de modificación post-traduccional (OlveraCarrillo et al., 2010a).

El análisis fenotípico se llevó a cabo sometiendo a déficit hídrico a plantas adultas (5-6 semanas de edad) de *A. thaliana* Col-0 (Wt), de la línea sobre-expresante de la proteína AtLEA 4-5 y de la línea mutante por inserción en el gen *AtLEA4-5(dSpm4-5)*. El análisis inicial se realizó en estas líneas, ya que los patrones del transcrito y de la proteína

mostraron una mayor acumulación para la AtLEA4-5 en relación a los otros miembros de la familia. Posteriormente, también se analizaron plantas en donde los genes *AtLEA 4-2* y *AtLEA 4-1* se silenciaron mediante microRNAs artificiales; así como plantas en las que los tres genes de la familia estaban silenciados (RNAi 4-5 y miRNA 4-1/2). Los resultados de este análisis mostraron que las plantas deficientes en estas tres proteínas presentaron un fenotipo de susceptibilidad al déficit hídrico; mientras que la sobre-expresora de la proteína AtLEA4-5 mostró una mayor tolerancia a estas condiciones de estrés (Fig. 6 y 7; OlveraCarrillo et al., 2010a)

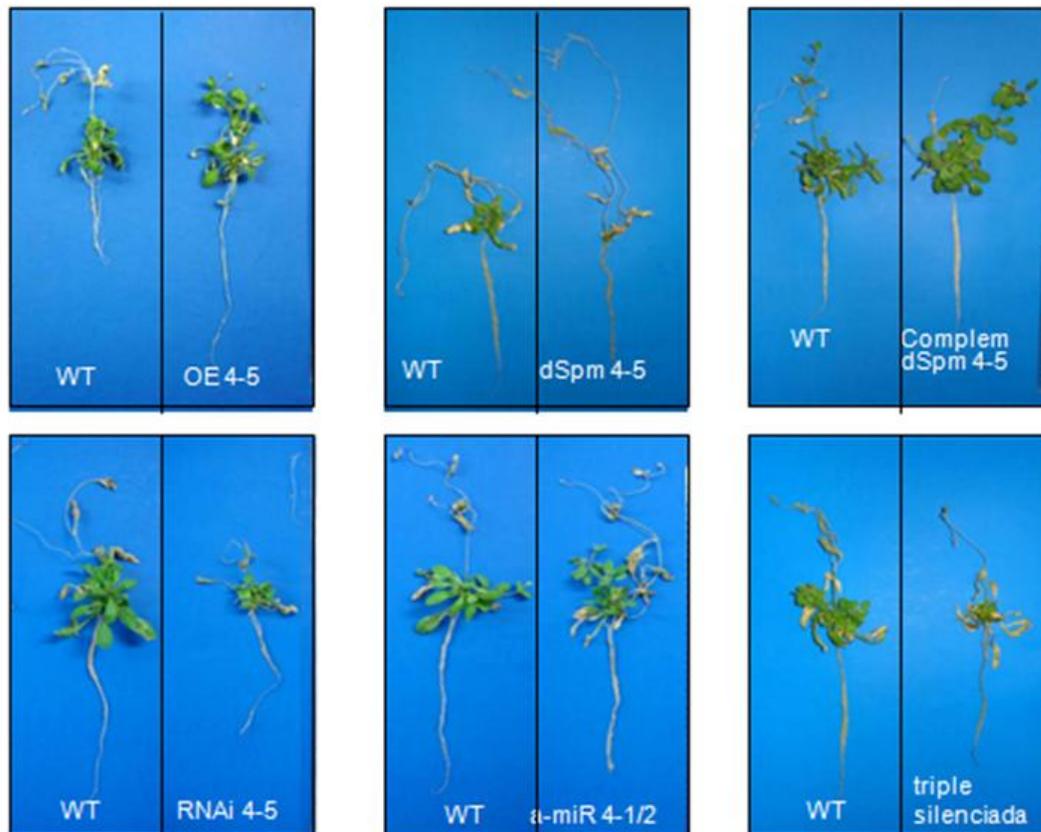


Fig. 6. Fenotipos de plantas transgénicas correspondientes a la familia LEA 4 en *A. thaliana*. Plantas adultas de 5-6 semanas de edad sometidas a sequia severa. WT, wild type; OE4-5, sobre-expresora de la proteína ATLEA4-5; dSpm4-5, mutante por transposición de la proteína ATLEA4-5; Complem dSpm4-5, complementada en el fondo mutante del transposón de la proteína ATLEA4-5; RNAi4-5, mutante silenciada por RNAi de la proteína ATLEA4-5; miR4-1/2, mutante silenciada por miRNA de las proteínas ATLEA4-1 y 4-2; triple silenciada, triple silenciada de la Familia ATLEA 4 generada por cruce de RNAi4-5 y miR4-1/2 (Olvera-Carrillo et al., 2010a)

Una característica sobresaliente del fenotipo que estas plantas mutantes mostraron fue cuando se determinó el número de botones florales y axilares en plantas sometidas previamente a sequía severa; las plantas sobre-expresoras de *AtLEA4-5* presentaron un mayor número de botones que las plantas silvestres y, en contraste, las plantas deficientes en estas proteínas mostraron una disminución considerable en el número de estos primordios, también en relación con las plantas silvestres. Esto llevó a hipotetizar que las proteínas de esta familia se acumulan en estos órganos y juegan un papel importante en su protección durante condiciones de estrés (Fig. 7) (Olvera-Carrillo et al., 2010a).

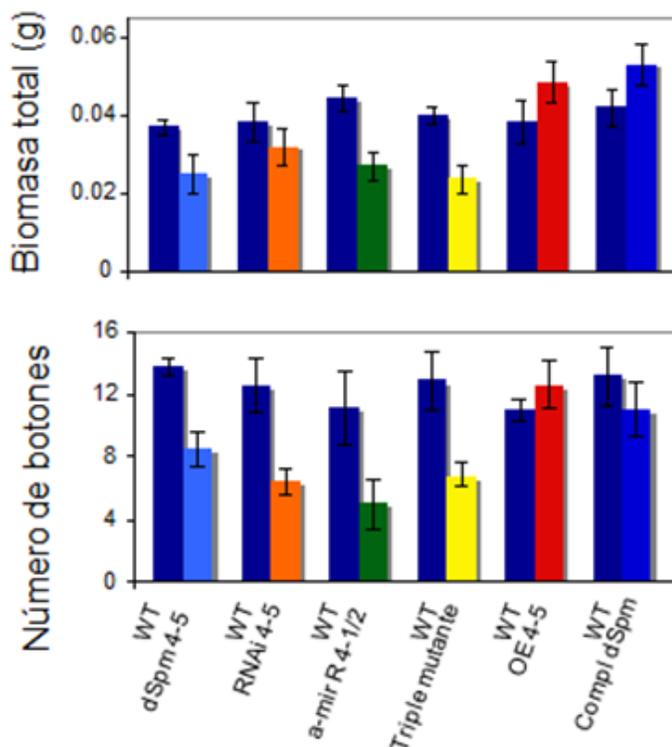


Fig. 7 Datos fenotípicos de biomasa total y número de botones en la planta de las diferentes transgénicas generadas de la familia *ATLEA4* en condiciones de sequía. Se puede observar que tanto en la biomasa como en el número de botones florales, las mutantes en la proteína *AtLEA4-5* (*dSpm4-5*) y la silenciada por RNAi en el gen *AtLEA4-5* (*RNAi4-5*) son las que presentan un fenotipo más afectado, mientras que en las sobre-expresoras se observa una mayor cantidad de biomasa como un mayor número de botones florales (Olvera-Carrillo et al., 2010a).

Importancia de la localización de las proteínas LEA en plantas

Si bien se ha estudiado la expresión de los transcritos y, en algunos casos, de la proteína en condiciones específicas de las proteínas LEA, se sabe poco acerca de su localización tisular e intracelular. Podemos citar algunos ejemplos como TaLEA1 en *Tamrix androssowii*, la cual se expresa en estrés por metales pesados (Gao et al., 2012) o la LEA Mlg3 (de maíz) en células epidérmicas de tabaco (Amara et al., 2011) que se encuentran localizadas en el citoplasma y en el núcleo, respectivamente; o bien el de la PvLEA18, una proteína del grupo 6 de *Phaseolus vulgaris*, que se localizó prácticamente en todos los tejidos en respuesta a estrés pero principalmente en los haces vasculares y en la epidermis de hojas o en haces vasculares y córtex de raíz, e intracelularmente en el citoplasma y en el núcleo (Colmenero-Flores et al., 1999). También se ha predicho su localización mediante análisis computacionales, como es el caso de la proteína EMB564 de maíz perteneciente al grupo 1 de las LEA. Esta proteína podría estar localizada en el núcleo, debido a la similitud de su secuencia y la presencia de motivos de unión a DNA (Wu et al., 2013). Se ha predicho que algunas de las proteínas LEA de *A. thaliana* podrían estar en el citoplasma, en los cloroplastos y en las mitocondrias, como es el caso de las proteínas del grupo 3 (Hundertmark e Hinch, 2008). Esto se debe a que en sus estructuras primarias poseen motivos de señalización hacia estos organelos. Sin embargo, se desconoce la localización de la gran mayoría de las proteínas LEA, como es el caso de la proteína AtLEA4-5.

Existen muchos avances en el campo de la biología de las plantas, sobre todo en la biología celular de las mismas, lo cual ha creado la necesidad de tener métodos que permitan la localización de las proteínas *in situ* a nivel de una resolución subcelular. Aunque en muchos casos se utilizan proteínas recombinantes fusionadas con proteínas reporteras fluorescentes para analizar su localización en plantas transgénicas que las expresen, en muchos casos resulta indispensable corroborar estos resultados con inmunolocalizaciones que nos permitan conocer dónde se acumula la proteína de interés, sin sufrir ninguna modificación adicional generada por la fusión de estas proteínas

reporteras; en particular, cuando la proteína a localizar es muy pequeña (como lo es el caso de las proteínas LEA), ya que la proteína de fusión pudiera presentar un patrón de localización artefactual debido a las alteraciones que esta fusión pudiera provocar a su estructura y/o localización funcional.

Ahora se sabe mucho acerca de la expresión de los genes de *Arabidopsis* bajo una amplia variedad de condiciones y tejidos. Aunque los datos sobre la expresión génica pueden decirnos mucho acerca de las interacciones genéticas, es necesaria la utilización de otros métodos que permitan conocer los niveles y la localización de las proteínas mismas, ya que permite acercarse con mayor fundamento a la función que la proteína realiza en las células vegetales, una pregunta relevante en el caso particular de las proteínas LEA y específicamente de la proteína AtLEA4-5.

Modelo de estudio: *Arabidopsis thaliana*

A. thaliana es una dicotiledónea de la familia Brassicacea. A pesar de que carece de valor comercial, ha demostrado ser un organismo ideal para estudiar varios aspectos de la vida de las plantas, como su desarrollo y sus respuestas a condiciones adversas en el ambiente. Crece naturalmente en regiones de Asia, Europa y en el Norte de África, y se ha introducido en otras áreas como Norteamérica y Australia.

Presenta varias ventajas que agilizan su investigación. Su tamaño es pequeño (30 cm aproximadamente) por lo que es posible crecer un gran número de plantas en un espacio reducido. Su ciclo de vida es relativamente corto (seis semanas) y produce más de 10,000 semillas por planta. Es diploide y se autofecunda, lo cual facilita mantener líneas y realizar cruces controladas. El tamaño de su genoma, organizado en 5 cromosomas, es uno de los más pequeños detectados en plantas (125 Mpb) y es fácilmente transformable empleando a la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* por la técnica de infiltración en flores. Además de las ventajas naturales de la planta, la investigación en genómica funcional de *Arabidopsis* se ha facilitado gracias a la disponibilidad de la secuencia de su genoma, el cual se estima que codifica más de 33,000 genes (incluyendo genes no codificantes). La información sobre el genoma de *Arabidopsis* se complementa ampliamente con un acervo muy completo de mutantes generadas y naturales, con datos de expresión global basados tanto en microarreglos como en secuenciación masiva de transcritos de diversos tejidos, estados de desarrollo, estreses bióticos o abióticos, tratamientos con diferentes hormonas y químicos, mutantes, etcétera (Wilson, 2000).

Hipótesis

- En condiciones de déficit hídrico, la proteína AtLEA4-5 se localiza en diferentes órganos y tejidos de la planta incluyendo en nichos de células que dan origen a las flores.

Objetivo general

- Determinar la localización tisular de la proteína AtLEA 4-5 en diferentes órganos de *A. thaliana* bajo condiciones de déficit hídrico.

Objetivos específicos

- Determinar la localización de la proteína AtLEA4-5 en zonas meristemáticas, botones florales y diferentes tejidos de plantas crecidas bajo déficit hídrico.
- Determinar si la proteína se localiza en zonas meristemáticas y botones florales en plantas crecidas en condiciones óptimas de hidratación.

Materiales y Métodos

- *Muestras*

Debido a que la proteína AtLEA4-5 es la que se acumula en niveles más altos y cuya deficiencia genera fenotipos más evidentes, se decidió llevar a cabo la localización de esta proteína en *A. thaliana*, ecotipo Columbia, en condiciones de déficit hídrico. Para esto se esterilizaron semillas, tanto silvestres (Wt) como mutantes en la proteína (dSpm4-5), 2 minutos con etanol y después con una solución de NaClO al 40% y tritón X-100 al 0.02%. Se enjuagaron 5 veces, durante dos minutos cada lavado con agua miliQ estéril, y se re-suspendieron en agarosa al 0.1% estéril. Posteriormente, se sembraron en cajas Petri con medio MS (4.3 g de sales Murashige and Skoog, 1% sacarosa, 0.5 g/L de MES y 0.7% de agar) pH 5.7 y se dejaron estratificar durante 4 días a 4°C en oscuridad. Después fueron transferidas a un cuarto de crecimiento a 25°C, con fotoperiodo de 16/8. Se incubaron por 2 semanas para ser trasplantadas posteriormente a macetas con sustrato turface, sustrato de arcilla calcinada con baja retención de agua.

El tratamiento de déficit hídrico se llevó a cabo bajo las condiciones previamente descritas (Olvera-Carrillo et al., 2010a), en las que se detectó una mayor acumulación de la proteína AtLEA4-5. Para esto se prepararon macetas con sustrato turface. Se utilizaron macetas de 3''x 3''x 3'' con 200 g de sustrato. Se trasplantaron plántulas de dos semanas de edad tanto silvestres como mutantes a las macetas cuyo sustrato se hidrató a capacidad de campo, colocando de dos a tres plantas por maceta para asegurar un óptimo crecimiento de los órganos de cada planta. Se regaron con solución nutritiva [5 mM KNO₃, 2.5 mM KH₂PO₄, pH 5.6, 2 mM MgSO₄, 2 mM Ca(NO₃)₂, 50 μM Fe-EDTA, micronutrientes (70 μM H₃BO₃, 14 μM MnCl₂, 0.5 μM CuSO₄, 1 μM ZnSO₄, 0.2 μM NaMoO₄, 10 μM NaCl, 0.01 μM CoCl₂)] se trasladaron al cuarto de crecimiento a 21°C, humedad relativa del 70% y fotoperiodo 16/8. Después de 5-6 semanas, cuando las plantas empiezan la etapa reproductiva, se sometieron a estrés, retirando el agua de las charolas y dejando las plantas por aproximadamente 5 días sin riego (cuando se llega a 50-55% de pérdida de agua en el sustrato). Se decidió recolectar en este punto el material, debido a que

anteriormente se había intentado incluir el material vegetal en parafina (ver más abajo), cuando la planta se encontraba con un porcentaje mayor a 60% de pérdida de agua, haciendo imposible obtener cortes adecuados para la inmunolocalización. En este punto se realizó la fijación e inclusión de diferentes órganos de la planta. Las plantas en condiciones control se mantuvieron con irrigación óptima. Todas las macetas se pesaron diariamente para controlar y determinar la pérdida de agua en el sustrato.

Experimentos tipo Western

- *Extracción de proteínas*

Se extrajo proteína total de las hojas y de los botones florales de plantas tanto Wt como dSpm4-5 crecidas bajo condiciones control y bajo déficit hídrico. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido, el tejido congelado se maceró en un mortero y se tomaron 200 mg aproximadamente en un tubo eppendorf que se mantuvo en nitrógeno líquido.

Para la extracción se agregaron 200 μ l de una mezcla en frío con 1/3 amortiguador de extracción con PVPP [sacarosa 0.7 M, de Tris-Base 0.5 M, HCl 30 mM, EDTA 50 mM, KCl 0.1M, β -mercaptoetanol al 2% y 12 mg/ml de polivinilpolipirrolidona (PVPP)] y 2/3 de fenol. La muestra se homogenizó con un homogeneizador con pistilo metálico, previamente enfriado en nitrógeno durante 5 segundos, a velocidad máxima durante 2 a 3 min. Se agregaron 200 μ l de la mezcla del buffer con el fenol y se agitaron vigorosamente durante 1 minuto. Después se centrifugaron las muestras a 7000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Posteriormente, se tomó la fase orgánica y se colocó en un tubo nuevo. Se agregó un mismo volumen de una mezcla en una proporción de 1/3 del amortiguador de extracción, pero ahora sin PVPP y 2/3 de fenol. Se agitó vigorosamente durante un minuto y se centrifugó a 7000rpm durante 10 minutos a 4°C. Se recuperó la fase orgánica y se colocó en un tubo eppendorf nuevo. Se agregó acetato de amonio 0.1 M en metanol hasta llenar el tubo (aproximadamente 1 ml) y se dejó precipitando toda la noche a -20°C.

Se centrifugaron las muestras a 7000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se lavó la pastilla obtenida tras la precipitación de proteínas con acetona al 80%, previamente enfriada a -20°C, para evitar que la pastilla se disolviera, y se dejó secando en la campana de extracción de 5 a 10 minutos, dependiendo de su tamaño. La pastilla se solubilizó con 20 µl de amortiguador de solubilización SDS (1% CHES, 2% SDS, 2% β-mercaptoetanol y 10% glicerol).

La concentración de proteínas en el extracto se determinó por el método de Lowry utilizando como referencia una curva estándar realizada con albúmina de suero bovino.

- *Electroforesis de proteínas*

El análisis electroforético de las proteínas se llevó a cabo en geles SDS-PAGE con Acrilamida/Bisacrilamida al 15%. Se cargaron alícuotas con 25 µg de proteína total y se separaron a 30 mV durante aproximadamente 2 h.

- Purificación de anticuerpo

Para la purificación del anticuerpo se utilizó una columna aminolink de Pierce (4% perlas de agarosa y .02% de azida de sodio) que ya tenía pegada la proteína AtLEA4-5. Se centrifugó la columna para eliminar el buffer de almacenamiento y equilibró la columna a temperatura ambiente con 6 ml de PBS1X (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4). Se colocó posteriormente 2 ml del anticuerpo y 200 µl de PBS1X y se incubó en agitación constante durante 1 hora. Se centrifugó la columna y se hicieron varios lavados con PBS1X para quitar el exceso de anticuerpo que no se pegó a la columna. Se recuperó el anticuerpo pegado a la columna con 2 ml de buffer de elución (glicina-HCl 0.2M a pH 3 que contiene buffer de neutralización 1M tris-HCl a pH 8.5) y se hicieron

posteriormente pruebas tipo western Blot para probar la eficiencia del anticuerpo purificado.

- *Experimentos tipo Western*

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Hybond C-Extra Supported, 0.45 micrones) en una cámara de transferencia en líquido con amortiguador de Tris 25 mM, glicina 0.2 M y metanol al 20% (v/v) durante 2 h a 100 mV y 650 Amp. La membrana se fijó con 10% de ácido acético y 25% de isopropanol y se verificó la transferencia mediante una tinción reversible con rojo Ponceau. Se incubó toda la noche a 4°C con TBST [TBS 1X (50 mM Tris-Cl, pH 7.5 y 150 mM NaCl), Tween al 0.1% y leche descremada al 5%]. Después se le agregó el anticuerpo primario anti-AtLEA 4-5 (Anticuerpo obtenido en el laboratorio) a la concentración indicada diluido en TBST, y se incubó durante una hora a temperatura ambiente en agitación constante; posteriormente, se lavó la membrana 5 veces con TBS con Tween 0.1%, durante 5 minutos por cada lavado para, posteriormente, incubar con el anticuerpo secundario (anti-conejo con peroxidasa conjugada) a la concentración requerida y diluido en TBST. La membrana se lavó 3 veces durante 5 minutos con TBS-Tween y se reveló agregando peróxido y luminol 1:1 a la membrana e incubando durante 5 minutos (Marca Pierce). La membrana se colocó entre dos acetatos y se puso en un cassette para revelado. Se utilizó película Kodak X-Omat para detectar la señal de la actividad de peroxidasa, exponiendo la película de 30 s a 30 min para, posteriormente, revelarla de manera estándar.

Para determinar la especificidad en el reconocimiento de las bandas que se logran detectar con los anticuerpos, se realizaron experimentos de competencia, en los que el anticuerpo se incubaba antes de ser utilizado para reaccionar con las proteínas en la membrana, con la proteína para la que fue generado, de tal forma que al ser saturado con su antígeno correspondiente ya no será capaz de reconocer al mismo en las proteínas en

la membrana. Esto dará como resultado una ausencia de señal en aquellas bandas que correspondan al antígeno de interés y, no así en el caso de aquellas proteínas que son reconocidas por otros anticuerpos (IgG) contenidos en el suero. Por tanto, por un lado, la membrana se incubó con TBST durante toda la noche en agitación constante a 4°C y, por otro lado, en un tubo eppendorf se incubaron 100 µg de la proteína AtLEA4-5 recombinante pura con 5 µl del anticuerpo 1:2000 en 1 ml de TBS 1X, en agitación constante durante toda la noche a 4°C. Se enjuagó la membrana con TBS y se agregaron 9 ml de TBST más el anticuerpo previamente competido, esto se incubó durante 1 h en agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente, la membrana se lavó 5 veces con TBS - Tween 0.1%, durante 5 min por cada lavado, y se incubó con el segundo anticuerpo 1:30,000 preparado en TBST. La membrana se lavó 3 veces durante 5 minutos con TBS-Tween 0.1%, y se reveló como se describió anteriormente.

Inmunohistoquímica

- *Fijación e inclusión del material*

Se tomaron muestras de tallo, hojas de la roseta, botones florales y laterales y de raíz. Se fijaron en PFA (paraformaldehído) al 4% con PBS 1X bajo vacío durante un minuto para después incubarlas durante 24 h en el fijador. Posteriormente, las muestras se deshidrataron por tratamiento con una serie de soluciones de etanol: 50, 70, 85 y 95%; 2 h por cada solución. Seguidamente, las muestras se pasaron tres veces por alcohol etílico absoluto, durante dos horas en los dos primeros pases, y durante toda la noche en el último. Se transfirieron a xilol para realizar tres pases de dos horas y se incluyeron en bloques de parafina derretida a 60°C, los cuales se enfriaron a temperatura ambiente para su posterior corte.

Los bloques de parafina se orientaron y se pegaron sobre bloques de madera para su mejor manipulación. Se cortaron las muestras con un micrótopo de rotación marca Leica modelo RM2125 RTS obteniéndose cortes de 6 µm los cuales se estiraron en un baño de

flotación con agua a 40°C, para finalmente colocarlos con ayuda de un pincel en portaobjetos Super Frost *pre-cleaned* (Fisher).

- *Desparafinación*

Para quitar la parafina del corte se hicieron tres lavados con xilol de 10 min cada uno. Después el corte se re-hidrató mediante tratamientos en una serie de soluciones de etanol (100, 90, 75, 50 y 25%) cada diez minutos cada uno y al final agua destilada estéril durante 10 minutos.

- *Inmunolocalización mediante fosfatasa alcalina*

Para llevar a cabo la inmunolocalización, los cortes se incubaron en las laminillas con PBS 1X durante 10 minutos; después se incubaron con solución de bloqueo (5% BSA y 0.1% Tween-20 en PBS 1%) durante 1 h y, a partir de este paso, las muestras se transfirieron a una cámara húmeda. Se incubaron durante toda la noche con el anticuerpo primario de conejo anti-AtLEA4-5 en una dilución de 1:10 en solución de bloqueo y, al día siguiente se lavaron 3 veces durante 10 min con la misma solución para eliminar el anticuerpo que no se unió. Después, la muestra se incubó durante 1 h con el anticuerpo secundario (anti-conejo) conjugado con fosfatasa alcalina (Zymed) a una dilución 1:100 durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se hicieron 5 lavados con solución de bloqueo para eliminar restos del anticuerpo secundario que no hubiese reaccionado.

- *Revelado de la fosfatasa alcalina*

Para hacer visible la reacción de la fosfatasa, ésta se reveló con los siguientes sustratos: Tris 100 mM, pH 9.5, NaCl 100 mM, MgCl₂ 50 mM, 0.2 mg/ml de NBT (cloruro de nitroazul de tetrazolio) y 0.2 mg/ml de BCIP (5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato). Estos sustratos reaccionan con la fosfatasa alcalina conjugada al anticuerpo secundario, formándose un precipitado de color azul, que indica que la reacción se ha llevado a cabo en la localización del anticuerpo. Se dejó reaccionar hasta que se observó el color azul (3 min

aproximadamente). Como controles se usaron para el tallo y botones florales, cortes de plantas deficientes en la producción de la proteína AtLEA4-5 y para los controles en meristemas se usaron cortes de plantas wt incubados sin el anticuerpo primario y se les aplicó el mismo tratamiento de revelado.

- *Deshidratación y montaje*

Las muestras se deshidrataron de nuevo utilizando una serie de soluciones de etanol (25, 50, 75, 90 y 100%) durante 10 min en cada caso y después se lavaron 3 veces con xilol. Se dejaron secar un poco para eliminar los restos de xilol y se colocó una gota de medio de montaje (Invitrogen) y encima un cubreobjetos de 0.13 - 0.17 mm. Las muestras se dejaron secar en una superficie plana durante toda la noche.

- *Observación de las muestras*

Las muestras se observaron en un microscopio óptico Nikon E2000 con los objetivos 10X, 20X, 40X y 100X. Se utilizó aceite de inmersión (Nikon) para observar las muestras con el objetivo 100X. Las muestras se almacenaron a 4°C para posteriores observaciones.

RESULTADOS

Establecimiento de las condiciones de crecimiento

La gran mayoría de las observaciones y de los análisis microscópicos de tejidos vegetales se realizaron a partir de plantas crecidas bajo condiciones de irrigación óptima; con la finalidad de obtener muestras de tejidos con la calidad necesaria para detectar adecuadamente la proteína de interés, fue preciso probar diferentes tratamientos de déficit hídrico para seleccionar aquellas condiciones que no sólo elevaran los niveles de la AtLEA4-5 sino que también resultaran en tejidos íntegros después del tratamiento necesario para su análisis microscópico. Para ello se consideraron las condiciones previamente establecidas por Overa-Carrillo en su trabajo de tesis doctoral (Fig. 8) (Olvera-Carrillo et al., 2010a).

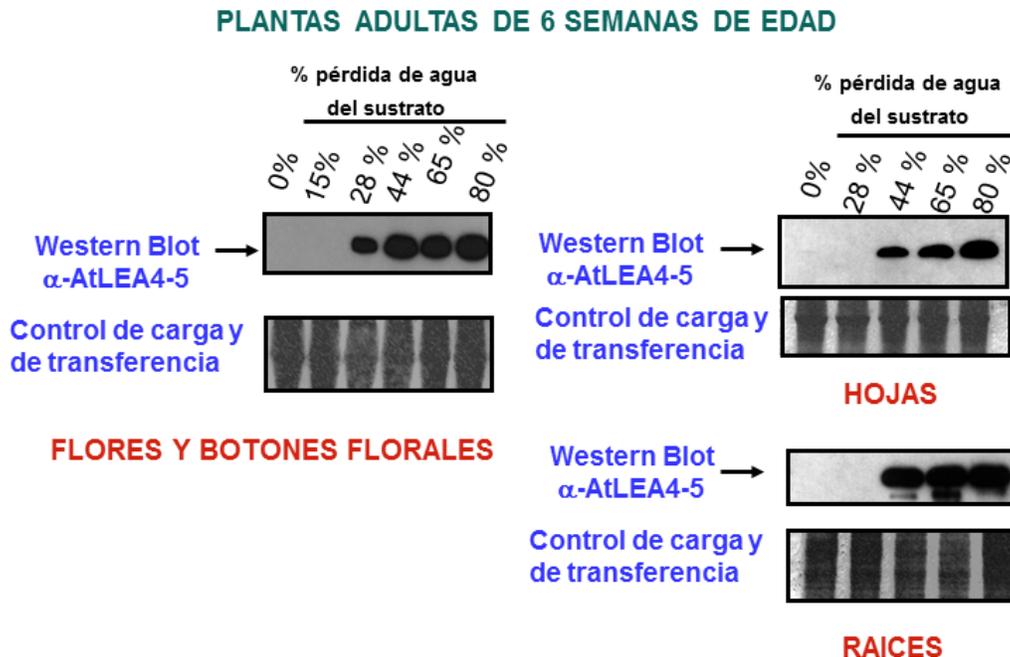


Fig 8. Acumulación de la proteína AtLEA4-5 en plantas de *A. thaliana* de 6 semanas de edad en diferentes órganos de la planta (hojas, raíces, flores y botones florales) durante diferentes porcentajes de pérdida de agua del sustrato. (Olvera-Carrillo et al, figura no publicada)

Se probaron condiciones en las que se había reportado que los niveles de la proteína AtLEA4-5 se elevaban y que no fueron demasiado severas como para inducir marchitez, por ello se usaron condiciones en las que el sustrato perdiera de 50% a 55% de agua (Fig. 9A); ya que, en trabajos previos del laboratorio se observa que una pérdida mayor de agua en el sustrato provoca que los tejidos de las plantas no se incluyan adecuadamente en parafina, dando como resultado cortes de baja calidad.

Por tanto, se crecieron plantas silvestres (Wt) y mutantes deficientes en la proteína AtLEA4-5 (dSpm4-5) durante 5-6 semanas y, después de 5 días, cuando se alcanzó el 50% a 55% de pérdida de agua en el sustrato (Fig. 9B) se cosechó material vegetal tanto para la inclusión en bloques de parafina como para ensayos tipo western, esto último con el fin de confirmar la acumulación de la proteína AtLEA4-5. También se obtuvo material a partir de plantas mutantes y silvestres crecidas bajo condiciones de irrigación óptima como control y referencia de este experimento.

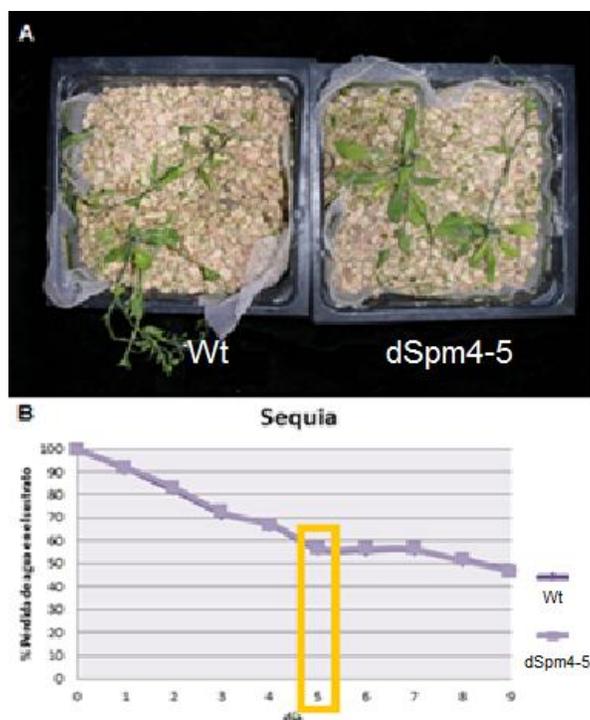


Fig. 9. (A) Plantas de *A. thaliana* Wt y dspm4-5 de 5-6 semanas sometidas a déficit hídrico las cuales alcanzaron 50%-55% de pérdida de agua en el sustrato a los 5 días. (B) Porcentaje de pérdida de agua en el sustrato durante la sequía

aplicada. Con un rectángulo amarillo se marca el día y el porcentaje de pérdida de agua en el sustrato en el cual se encontraban las plantas tomadas para las inclusiones en parafina y experimentos tipo Western blot.

La proteína AtLEA4-5 se acumula en los tejidos de plantas sometidas a déficit hídrico

Para la detección de la proteína AtLEA4-5 de la forma más específica posible se decidió evaluar tanto el suero obtenido tras la inmunización, conteniendo los anticuerpos policlonales anti-LEA4-5, así como un anticuerpo más puro enriquecido en IgG's contra la proteína de interés. Para ello el suero anti-AtLEA4-5 se sometió a una cromatografía de afinidad utilizando una columna de perlas de agarosa a las cuales se les unió la proteína AtLEA4-5 recombinante purificada. Para determinar la especificidad de los anticuerpos, éstos se reaccionaron en experimentos tipo Western contra extractos de proteínas obtenidas de plantas crecidas bajo condiciones de limitación de agua, o de semillas; como control positivo se incluyó a la proteína recombinante (Fig. 10). Los resultados mostraron que ambos anticuerpos, tanto el contenido en el suero como el inmunopurificado, reconocieron a una proteína arriba de 17KDa (aunque la proteína se predice con un peso de 16.2 KDa se ha visto que estas proteínas migran con un peso un poco mayor al esperado) correspondiente a la AtLEA4-5, en los extractos proteicos de plantas crecidas bajo déficit hídrico y en los de semilla; así como a la proteína AtLEA4-5 recombinante obtenida de bacterias, en donde se producen dos polipéptidos correspondientes a la AtLEA4-5 debido a que el marco abierto de lectura posee una metionina interna de la cual también se inicia la traducción generando así una proteína que corresponde la AtLEA4-5 completa y otra versión más pequeña que carece de los primeros amino ácidos. El suero mostró un reconocimiento específico a una dilución 1:2000 (Fig. 10A), en tanto que el anticuerpo inmunopurificado lo hace a una dilución 1:500 (Fig. 10B).

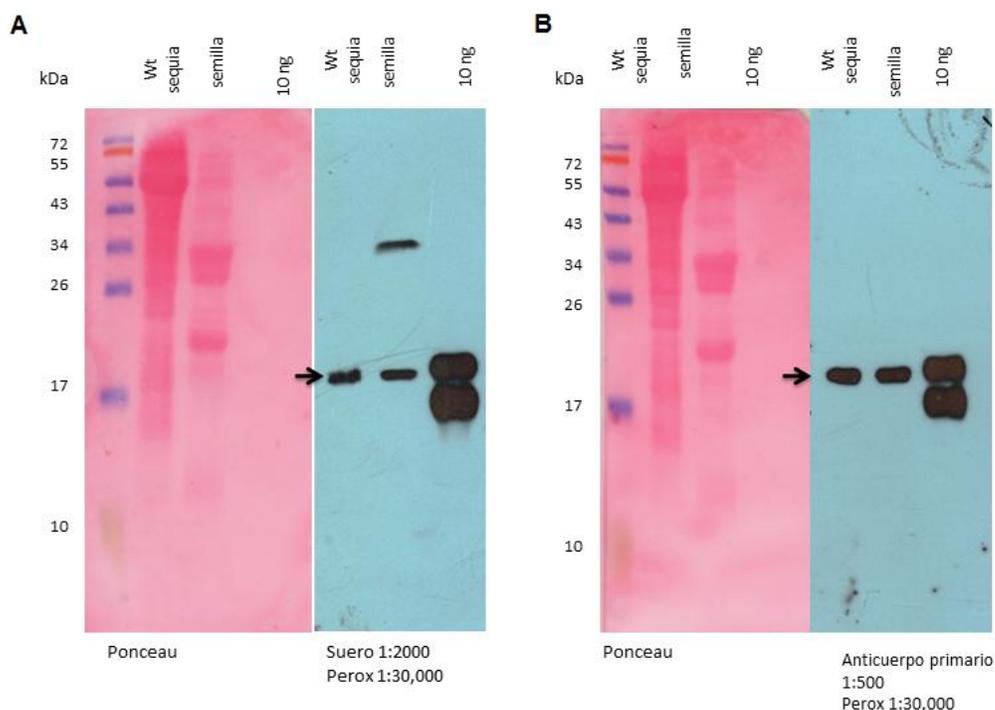


Fig.10. Detección de la proteína AtLEA4-5 por medio de experimentos tipo Western en extractos de proteínas obtenidos de hojas de plantas silvestres (Wt) crecidas bajo condiciones de déficit hídrico, de semilla y, como control positivo, la proteína AtLEA4-5 recombinante. (A) En el panel izquierdo se muestra la tinción de las proteínas transferidas con rojo de Ponceau, y en el panel derecho se muestra la detección con el anticuerpo primario contra AtLEA4-5 sin purificar (suero). (B) En el panel izquierdo se muestra la tinción de las proteínas transferidas con rojo de Ponceau, y en el derecho la detección con el anticuerpo primario contra AtLEA4-5 inmuno-purificado. La flecha indica la banda correspondiente a la proteína AtLEA4-5 con una masa molecular aproximada de 16kDa. La exposición fue de 30 s.

Debido a que el suero nos dio una detección limpia y un título mayor comparado con el anticuerpo inmunopurificado en las muestras sometidas a déficit hídrico, se decidió corroborar la especificidad en el reconocimiento por medio de una competencia en la que el suero se incubó con la proteína AtLEA4-5 pura (100 μ g) de tal forma que si las bandas que se detectaban correspondían a la AtLEA4-5, después de la competencia los mismos anticuerpos ya no las reconocerían. La Figura 11 muestra el experimento tipo Western en el que se muestra que el suero anti-AtLEA4-5 reconoce específicamente a esta proteína tanto en extractos proteicos de hojas de plantas estresadas como de los provenientes de semillas (Fig. 11B); ya que al competir el suero con la proteína AtLEA4-5 pura, éste es

incapaz de detectar a la misma en los mismos extractos (Fig. 11C). También se muestra que en semillas el suero detecta de manera específica una proteína de mayor masa molecular (36 kDa, aproximadamente), lo cual sugiere que esta banda podría corresponder a un homo- o hetero-oligómero de la proteína AtLEA4-5. Se descartó que fuese una proteína de mayor masa molecular relacionada a la misma debido a que no se detecta alguna con estas características a partir de la secuencia del genoma de *Arabidopsis*.

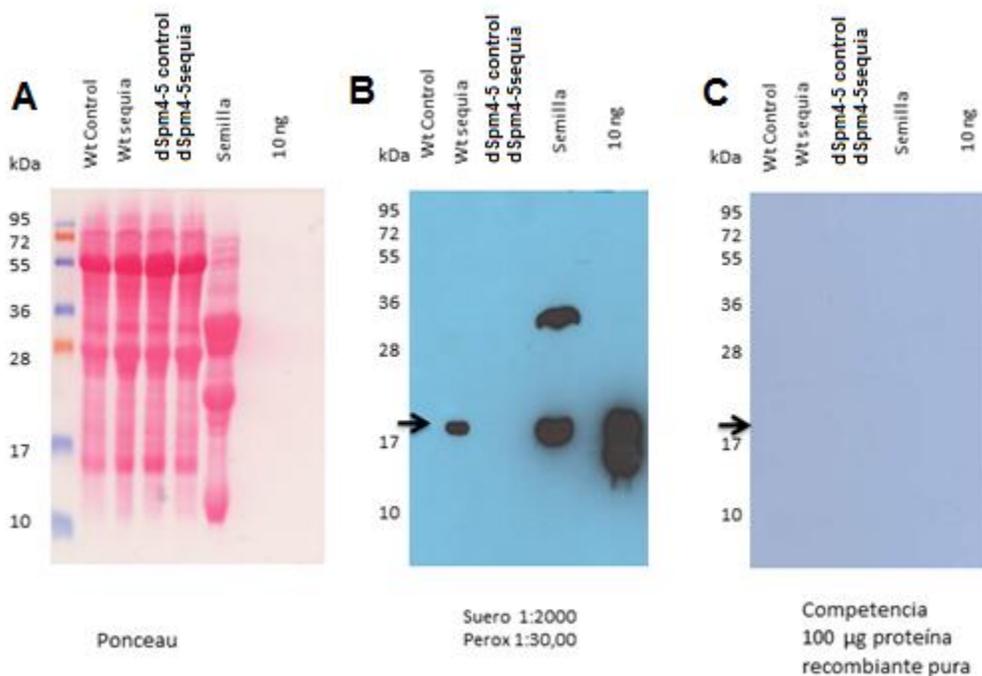


Fig. 11. El suero anti-AtLEA4-5 detecta de manera específica a la proteína AtLEA4-5. (A) Muestra de la transferencia y la carga de proteína por carril por tinción con Rojo de Ponceau. (B) Experimento tipo Western usando el anticuerpo sin purificar (suero), en donde se observa la detección de la proteína AtLEA4-5 en extractos de proteínas obtenidos de plantas silvestres crecidas en condiciones de déficit hídrico, de semillas y de la proteína recombinante. (C) Competencia con 100 µg de la proteína recombinante pura donde no se observa la detección de la proteína de interés como se esperaría si el reconocimiento es específico para la proteína con la que se compitió.

La proteína AtLEA4-5 se detecta en los tejidos sometidos a déficit hídrico

Una vez verificada la especificidad del anticuerpo a utilizar en la detección de la proteína AtLEA4-5, se planteó hacer la inmunodetección con anticuerpos secundarios acoplados a fluorescencia (Cy3) con la finalidad de incrementar la sensibilidad.

Para la inmunolocalización de la proteína AtLEA4-5 en un principio se decidió seguir el protocolo reportado por Sauer et al. (2006), el cual es un método rápido, fácil y sensible para plantas de *Arabidopsis*. Este protocolo permite la eliminación de la clorofila de las hojas y así evita que ésta intervenga en la señal de fluorescencia, permitiendo también la utilización de las raíces, las cuales son un mejor sistema para aplicar la detección con fluorescencia debido a que no presentan interferencia por carecer de clorofila. Para este objetivo se utilizaron plántulas de *Arabidopsis* de dos semanas de edad que fueron trasladadas a cajas Petri con medio líquido con una concentración de PEG-8000 al 25% donde se mantuvieron por 12 h. En estas condiciones la proteína AtLEA4-5 también se expresa (Fig. 5); sin embargo, la detección no fue exitosa ya que no se lograron obtener las condiciones para evitar la fluorescencia de fondo debido a que no se lograba eliminar del todo el anticuerpo secundario que no había reaccionado (Anexo 1). Otro problema que se detectó fue que las plantas que fueron sometidas a estrés no mantuvieron la integridad tisular necesaria para lograr detecciones confiables. Por ello se optó por utilizar un método de detección más conservador sobre cortes de muestras incluidas en parafina [ya que anteriormente se había intentado la inclusión en resinas como LRWhite, pero la permeabilización del anticuerpo no era buena (datos no mostrados)]. Por lo tanto, siguiendo el método descrito en la sección de Materiales y métodos, se incluyeron muestras de raíces, de tallos, de hojas, de botones florales, de botones laterales y de regiones conteniendo el meristemo apical que, en plantas de 15 días, se localiza en la parte de la roseta. De estas regiones, de las únicas que no fue posible obtener cortes adecuados fue de las hojas (datos no mostrados) y de las raíces debido a que el tejido en déficit hídrico era muy susceptible al momento de incluirlo y los cortes se desintegraban. Para el caso de tallo se pudieron obtener cortes adecuados, tanto de plantas crecidas bajo condiciones óptimas de irrigación, como de plantas crecidas en condiciones en déficit

hídrico. Cortes obtenidos de plantas mutantes crecidas bajo estrés fueron utilizados como controles negativos, ya que en ellas no se esperaba encontrar señal con los anticuerpos anti-AtLEA4-5, de acuerdo a los resultados obtenidos de los experimentos tipo western (Fig. 11b)

Los resultados obtenidos mostraron que la proteína AtLEA4-5 está presente en todos los tejidos del tallo de plantas silvestres (Fig. 12B). La señal que se detectó en estos experimentos se pudo calificar como específica dado que en los cortes obtenidos de tallos de las plantas mutantes deficientes en AtLEA4-5 crecidas bajo las condiciones de déficit hídrico, en las que se sabe que la proteína AtLEA4-5 se acumula, no se detectó señal positiva (Fig. 12A). Como se observa en la Fig. 12D, la señal de la proteína AtLEA4-5 se detectó alrededor de las grandes vacuolas que ocupan la mayor parte del espacio intracelular; esta señal es difusa alrededor de lo que correspondería a prácticamente todo el citosol. En el parénquima también se detectaron ciertas zonas en el citosol con una mayor acumulación de la proteína, aparentemente, alrededor de organelos que parecen ser cloroplastos (Fig. 12C), en tanto que la mayor concentración se detectó en zonas que pudieran corresponder a núcleos, lo que es más fácilmente apreciable en las células de la médula y el esclerénquima (Fig. 12D y 12E). Los diversos tipos de agregados también se detectaron en las células del mesófilo y del esclerénquima (Fig. 12E).

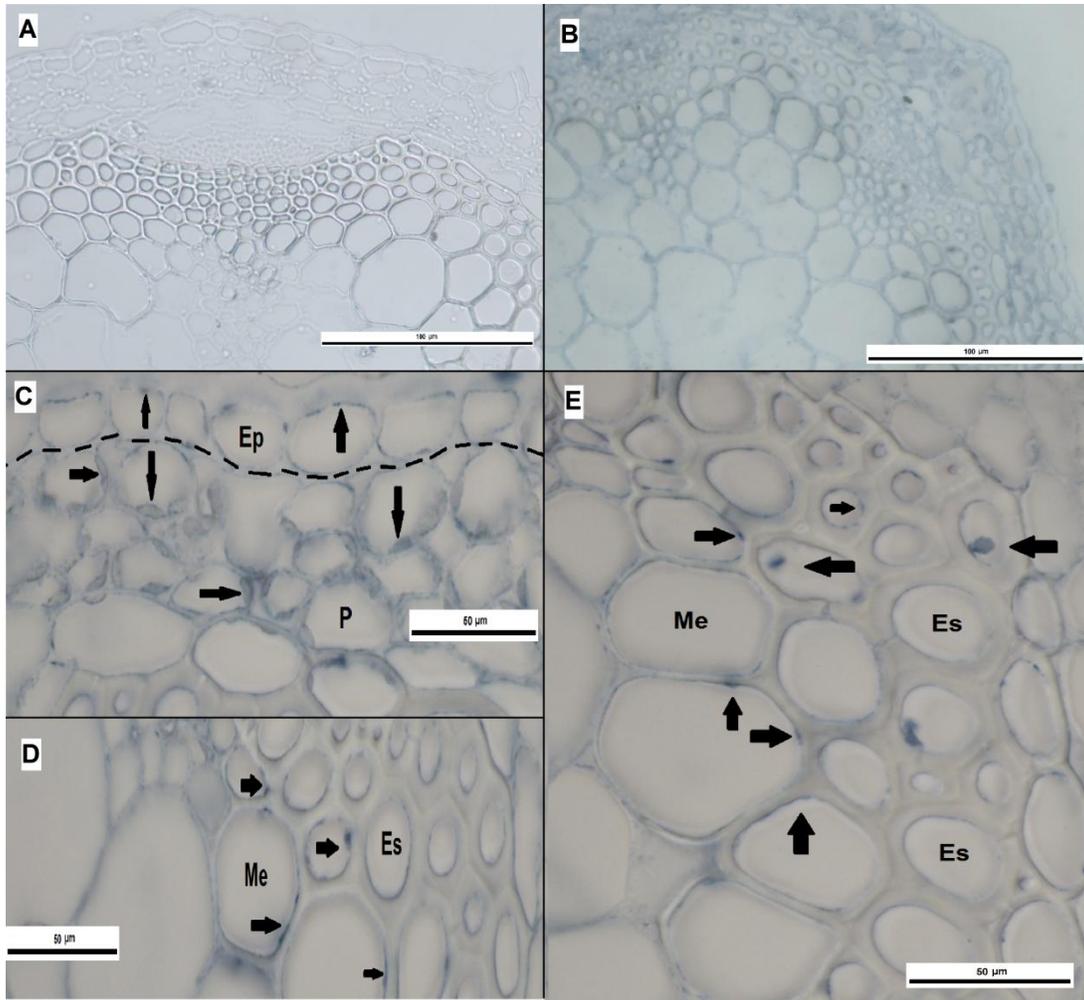


Figura 12. Inmunolocalización de la proteína AtLEA4-5 en tallos de *Arabidopsis* crecidas en condiciones de déficit hídrico. (A) Tallo de planta de *Arabidopsis* deficiente en la producción de la proteína AtLEA4-5 (dSpm4-5), crecidas bajo déficit hídrico. Se utilizó como control y no se observa detección alguna de la proteína, tal y como se esperaba. (B) Inmunolocalización en tallos de plantas silvestres crecidas bajo déficit hídrico. Se muestra una vista parcial del tallo en donde es posible apreciar los diferentes tejidos que lo componen (C) Inmunodetección de la proteína en epidermis y parénquima (córTEX) de tallos de plantas silvestres sometidas a limitación de agua. Las flechas señalan aquellos puntos que mostraron mayor señal y, por tanto, mayor concentración de la proteína. La línea punteada muestra la separación entre las células de la epidermis y del parénquima (D) Detalle de la inmunodetección en células de la médula y del esclerénquima en tallos de plantas silvestres sometidas a déficit hídrico. Es posible observar con mayor claridad la vacuola que cubre la mayor parte del espacio intracelular, alrededor de la cual es visible la proteína, lo que indica una distribución generalizada en el citoplasma aunque con ciertas zonas en las que se detecta con mayor intensidad, algunas se señalan con flechas. (E) Detalle de la inmunodetección en médula y esclerénquima en una zona diferente del tallo de plantas silvestres crecidas bajo estrés. El anticuerpo primario AtLEA4-5 se utilizó en una dilución 1:10 mientras que el anticuerpo secundario con fosfatasa alcalina se utilizó 1:100. (Ep) epidermis, (P) parénquima, (Me) Médula, (Es) Esclerénquima. La escala se encuentra en micrómetros.

Debido a que uno de los fenotipos que mostraron las plantas deficientes en la AtLEA4-5 fue una disminución en el número de botones axilares y florales, y a que el impacto sobre estos órganos se fortaleció con los fenotipos que mostraron las plantas que sobre-

expresan esta proteína; en donde se observó un mayor número de ambos tipos de botones, surgió el interés de saber si la proteína AtLEA4-5 se encontraba localizada en estas regiones. Se intentó detectar esta proteína en botones florales o axilares y en otras regiones meristemáticas de plantas crecidas bajo condiciones tanto de riego óptimo como de déficit hídrico.

Se llevaron a cabo múltiples intentos por obtener cortes de buena calidad de las zonas con botones axilares de plantas deficientes en la AtLEA4-5 bajo estrés. Sin embargo, esto no fue posible debido a la fragilidad que adquieren los tejidos bajo dichas condiciones adversas. Por otro lado, sí fue posible obtener cortes con la calidad suficiente a partir de plantas silvestres crecidas bajo condiciones de estrés, por lo cual en este caso el control utilizado para la inmunodetección fueron cortes de plantas silvestres en condiciones de déficit hídrico sin anticuerpo primario, comprobando que el anticuerpo secundario no reaccionaba con otras proteínas de la planta (Fig. 13A). Como se muestra en la Fig. 13B, fue posible detectar la proteína AtLEA4-5 en los botones axilares, en donde se localizó abundantemente en la zona citoplásmica de las células de los primordios foliares, mostrando el mismo patrón a manera de “agregados” alrededor de lo que pudiera corresponder a vesículas membranales u organelos (Fig. 13C). En la zona del meristemo es posible apreciar su localización de manera difusa en la zona citoplásmica de prácticamente todas las células del corpus pero más abundantemente en las células de la primera capa de la túnica (Fig. 13C).

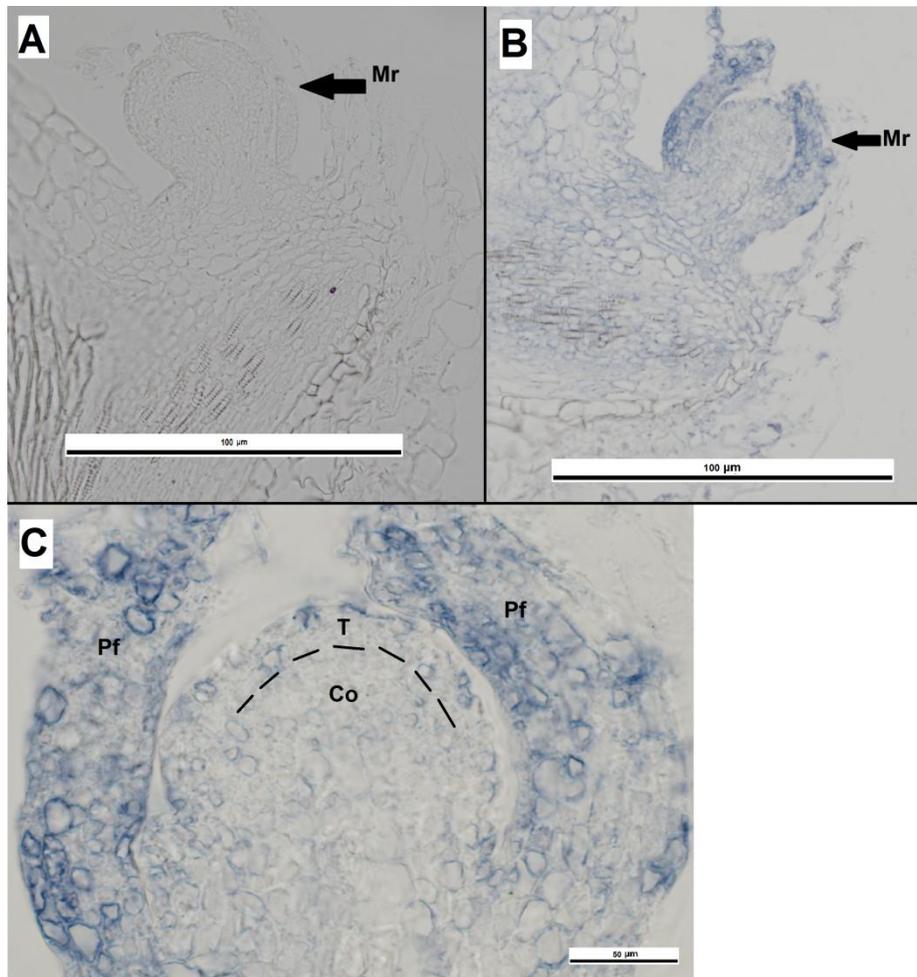


Fig. 13. Inmunodetección de AtLEA4-5 en cortes de regiones de botones axilares de plantas silvestres crecidas bajo condiciones de déficit hídrico. (A) Inmunodetección utilizando sólo el anticuerpo secundario (sin anticuerpo primario anti-AtLEA4-5), en donde se muestra que el anticuerpo secundario no produce ninguna señal y valida la especificidad de la detección (Control negativo). (B) Inmunodetección con el anticuerpo primario anti-AtLEA4-5 a una dilución 1:10 y con el anticuerpo secundario con fosfatasa alcalina a una dilución 1:100. (C) En un acercamiento de la imagen en el panel B se detecta la proteína en primordios foliares, mientras que en la zona meristemática la señal es más fuerte en las células de la túnica que en las células del corpus. La línea punteada denota la separación de las células del corpus y de la túnica. (Me) meristemo, (Pf) primordio foliar, (T) túnica, (Co) Corpus. La escala se encuentra en micrómetros.

Fue posible obtener buenos cortes de plantas silvestres crecidas en condiciones de déficit hídrico para la detección en botones florales. Como se muestra en la Fig. 14B, la proteína AtLEA4-5 se detectó en botones florales, donde también se aprecia que la proteína se

encuentra en la zona del citoplasma de todas las células de la región incluyendo a las hojas que rodean al botón y la pequeña porción de tallo. En las yemas axilares se observa una mayor detección en las células de la túnica comparado con las células del corpus (Fig. 14D). No se detectó señal en las células que conforman el cáliz o los sépalos de la flor a pesar de ser las regiones más externas de este órgano en formación, solo en las células que darán lugar a los órganos sexuales (Fig. 14C). En este caso se utilizó como control negativo la detección en las plantas mutantes deficientes en la proteína AtLEA4-5 en donde en consecuencia no se obtiene señal, validando la especificidad de la localización (Fig. 14A).

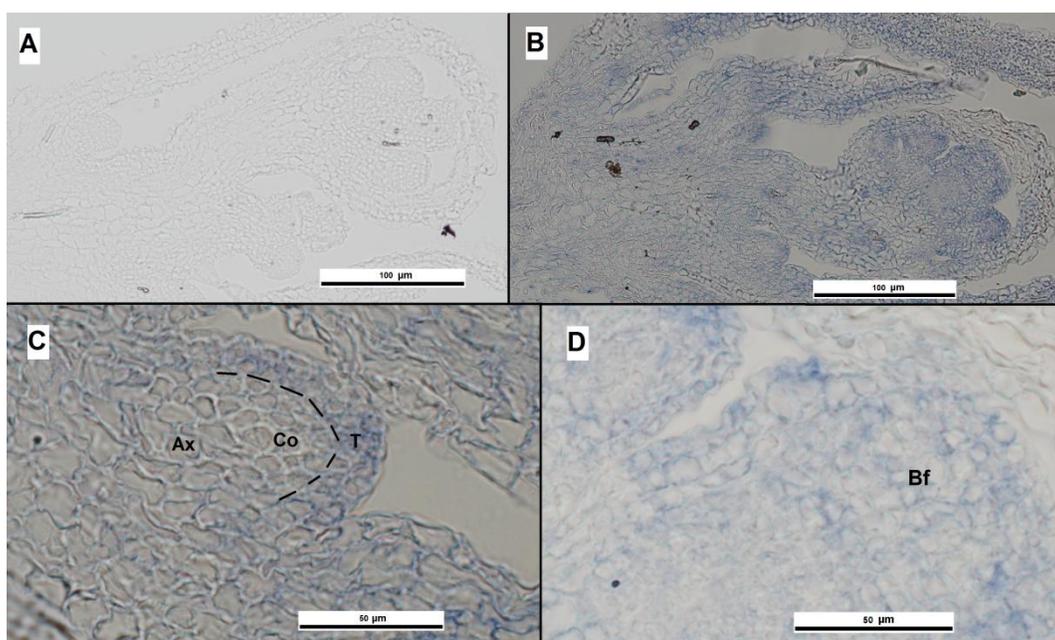


Fig. 14. Inmunodetección de la proteína AtLEA4-5 en botones florales de plantas de *Arabidopsis* crecidas en condiciones de déficit hídrico. La inmunolocalización se realizó con el anticuerpo primario AtLEA4-5 en una dilución 1:10 y el anticuerpo secundario con fosfatasa alcalina en una dilución 1:100. (A) Como control negativo en cortes de botones de plantas dSpm4-5 que no producen la proteína de interés, crecidas en condiciones de limitación de agua; No se observa detección de la proteína AtLEA4-5. (B) Detección de la proteína AtLEA4-5 en botones florales, en yemas axilares y en hojas aledañas en la periferia de los botones de plantas silvestres crecidas bajo condiciones de estrés. (C) Acercamiento de la detección de la proteína AtLEA4-5 en la zona del botón floral. (D) Acercamiento de la detección de la proteína AtLEA4-5 en la zona de las yemas axilares en donde se aprecia una mayor detección en las células de la túnica. La línea punteada en el panel D denota la separación de las células del corpus (Co) y la túnica (T). (Bf) botón floral, (H) hoja, (Ax) yema axilar. La escala se encuentra en micrómetros.

En la Fig. 15 se muestran cortes longitudinales de botones florales en donde se confirma la presencia de la proteína AtLEA4-5 en la zona que rodea a la vacuola, que correspondería al citoplasma de las células que conforman estas estructuras y en donde se aprecia nuevamente el patrón granuloso de acumulación de esta proteína. Debido a la baja resolución que se alcanzó en esta observación, no es posible determinar la naturaleza de los gránulos.

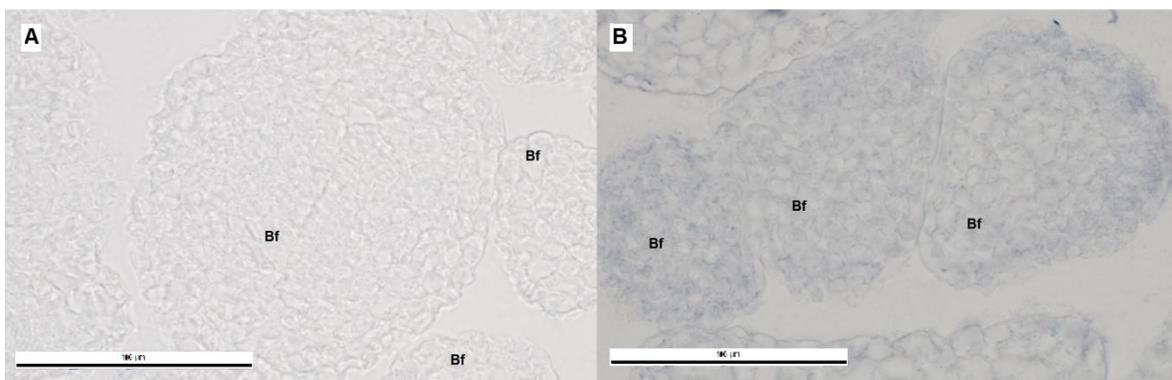


Fig. 15. Inmunodetección de AtLEA4-5 en cortes transversales de botones florales. (A) Como control negativo se utilizaron cortes de botones dSpm4-5. (B) La inmunodetección se realizó con el anticuerpo primario 1:10 y el anticuerpo secundario 1:100. Se puede observar la detección de la proteína en los botones florales de las plantas silvestres. (Bf) botón floral. La escala se encuentra en micrómetros.

También se intentó localizar a la proteína AtLEA4-5 en hojas de la roseta y en raíces; sin embargo, no se lograron obtener cortes con la calidad suficiente para lograr una localización confiable. A pesar de ello, se seleccionaron algunas de las inclusiones de cortes de raíces que mostraron el menor daño para obtener algunos datos preliminares de su localización en este órgano de plantas sometidas a déficit hídrico. Como se muestra en el corte de raíz en la Fig. 16, la raíz sufrió alteraciones de forma y cierto daño en todos los tejidos, principalmente en las células de la epidermis, donde la mayoría se desprendieron (Fig. 16A). Sin embargo, fue posible detectar a la proteína y determinar su localización

tisular en las zonas menos dañadas. Se aprecia abundante en el floema y, en menor cantidad en el córtex y en la médula (Fig. 16B). Nuevamente, la proteína AtLEA4-5 se detectó alrededor de la vacuola y mostró un patrón granulado, al parecer alrededor de vesículas de naturaleza desconocida (Fig. 16B).

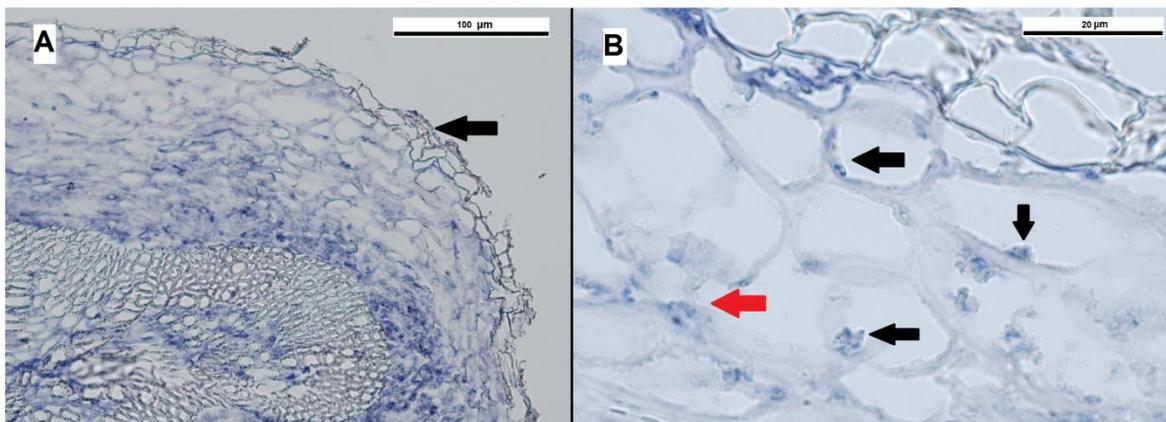


Fig. 16. Inmunolocalización de la proteína AtLEA4-5 en raíces de plantas silvestres de *Arabidopsis* crecidas en condiciones de déficit hídrico. La inmunolocalización se llevó a cabo con el anticuerpo primario AtLEA4-5 a una dilución 1:10 y el anticuerpo secundario con fosfatasa alcalina a una dilución 1:100. (A) Aunque las raíces se deformaron en el corte fue posible detectar en ellos a la proteína AtLEA4-5. (B) Un aumento de la imagen permitió apreciar células dañadas y algunas ya rotas (flecha roja) y también el patrón granulado previamente observado en otros órganos (Flechas negras). La escala se encuentra en micrómetros.

DISCUSIÓN

Los experimentos realizados utilizando al anticuerpo contra la proteína AtLEA4-5 (suero) mostraron que éste es específico para la proteína de interés y que sólo detecta a la proteína en condiciones que hasta ahora se sabe se expresa: déficit hídrico. Esto se comprobó en extractos de proteína total de plantas en condiciones de déficit hídrico, ya que fue posible detectar una banda correspondiente a una masa molecular aproximada de 16 kDa, mientras que en plantas mutantes por inserción de T-DNA, no se detectó ninguna banda. Con esto en cuenta, se pudieron llevar a cabo las inmunodetecciones en diferentes órganos y tejidos de *A. thaliana*.

En un principio se utilizó un protocolo de inmunofluorescencia en órganos completos de la planta (Sauer et al., 2006). Sin embargo, se comprobó que este protocolo no es adecuado para tejidos en condiciones de estrés, en este caso déficit hídrico, aunque el protocolo decía que podía aplicarse para cualquier condición en *Arabidopsis* (Anexo 1), por lo cual se decidió utilizar una técnica inmunohistoquímica que permitiera mantener la integridad del tejido. Se logró montar un protocolo para la inclusión en parafina de plantas de *Arabidopsis* en condiciones de estrés, el cual nos permitió obtener cortes adecuados para algunos de los órganos de la planta.

En el caso del tallo, se pudo observar que la proteína se encuentra en todos los tejidos. La proteína se encontró principalmente en el citoplasma, en el caso de la epidermis y de la médula, con un patrón parecido a agregados; en células del parénquima (córtez) además se encontró alrededor de cuerpos que se presume podrían ser cloroplastos; en el caso del esclerénquima también se pudo apreciar la proteína en núcleos de células en desarrollo, donde se sabe que el núcleo aún está presente y es muy grande.

Otro de los objetivos era localizar la proteína en meristemas y botones florales, ya que la mutación y la sobreexpresión de esta proteína provocaba un fenotipo en el número de

botones florales, por lo que se esperaba que la proteína se encontrara localizada en estas regiones. En meristemas bajo condiciones de déficit hídrico se observó la localización de la proteína tanto en primordios foliares como en células de la túnica y el corpus, siendo más fuerte la detección en células del corpus. En botones florales, los cortes nos permitieron ver que la proteína se localiza en el interior de estructuras que darán lugar a la flor, en las hojas que rodean a los botones y en las yemas axilares que se encuentran a los costados de las estructuras florales, siendo más fuerte la detección en esta zona.

En un principio se quiso inmunodetectar a la AtLEA4-5 en hojas y en raíces, ya que en estos órganos se detectó en ensayos tipo Western blot en trabajos anteriores (Olvera-Carrillo et al., 2010a) así como en este mismo. Sin embargo, debido a la fragilidad de los tejidos como las hojas, que son muy afectadas en su estructura cuando son sometidas a déficit hídrico, no se pudieron obtener cortes con una calidad óptima (datos no mostrados). En el caso de la raíz, aunque se obtuvieron algunos cortes, la calidad no era la esperada, ya que, si bien se pudo detectar la proteína en algunos tejidos como el córtex y la endodermis, en otros tejidos como la epidermis no se pudo observar si había presencia o ausencia de la proteína, debido a que las células se desprendían. A nivel celular parecía que la proteína se encontraba en el citoplasma, a manera de agregados como se había observado anteriormente; sin embargo, debido al estado de las células algunas se encontraban rotas y amontonadas.

CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos podemos decir que la AtLEA4-5 se encuentra localizada en casi todos los tejidos de los órganos analizados y en los botones florales, como se había predicho en condiciones de déficit hídrico; a nivel celular se encuentra a manera de agregados en el citosol y en el núcleo. El que esta proteína se encuentre localizada en tallos, zonas meristemáticas y botones florales sugiere que esta proteína está llevando a

cabo alguna función relevante, la cual se ve reflejada con un fenotipo de susceptibilidad al déficit hídrico, cuando la planta es deficiente en su producción. Estos resultados, junto con los reportados por Olvera-Carrillo et al (2010a) refuerzan la idea de que la proteína AtLEA4-5 le confiere tolerancia a la planta en condiciones de déficit hídrico, en donde podría estar protegiendo a los diferentes órganos y tejidos de la planta y principalmente algunos componentes de la célula.

PERSPECTIVAS

Como perspectivas del trabajo de la proteína LEA4-5 en *A. thaliana*, se espera:

- Obtener cortes adecuados de meristemas y botones florales en condiciones de riego óptimo para verificar si esta proteína pudiera estar expresándose también en estas condiciones y teniendo un efecto en la producción de brotes.
- Corroborar estos datos mediante otras técnicas como fusiones traduccionales (proteínas de fusión) o fusiones transcripcionales, con el fin de analizar al promotor con GFP o GUS (experimentos en proceso).

ANEXO 1

Immunolocalización con anticuerpos acoplados a fluorescencia

En un principio se intentó hacer la localización *in situ* en raíces de plántulas de dos semanas de edad, sometidas a estrés mediante PEG-8000 al 25%, una condición en la cual se había visto que la proteína AtLEA4-5 se expresaba (Olvera-Carrillo et al., 2010a). Para esto se utilizó un protocolo recomendado para localización *in situ* de proteínas en diferentes órganos de las plántulas (Sauer et al., 2006). En este protocolo. Las raíces y las hojas son primeramente fijadas con PFA (paraformaldehído) para ser sometidas a un tratamiento con agentes que degradan la pectina y la celulosa de la pared celular (DRISELASA) y hacer permeable la membrana plasmática (IGEPAL CA-630) y permitir la permeabilización tanto del anticuerpo primario como del anticuerpo secundario; para hojas además se aplicaron varios pasos por metanol para eliminar la clorofila. Sin embargo este protocolo es aplicado para plantas en condiciones óptimas en donde las células no han sufrido daño alguno, en comparación con plantas sometidas a déficit hídrico, las cuales ya traen cierto daño celular. Creemos que esta es la causa por la cual las raíces (Fig. 17) y hojas (datos no mostrados) tratadas mediante este protocolo quedaban en condiciones que permitían que el anticuerpo secundario acoplado con Cy3 (rojo-naranja), que no había reaccionado con el anticuerpo primario, quedara atrapado en las células de nuestros controles (en este caso raíces de plántulas dSpm4-5 sometidas a estrés) donde esperábamos no ver fluorescencia. La detección en raíces Wt (Fig.17A) era muy similar en raíces N (Fig.17B), con lo cual no se podía tener una detección confiable de la proteína, ya que existía demasiado ruido de fondo. A pesar de que se modificó la cantidad de lavados y el tiempo de permeabilización, se seguían obteniendo resultados similares, por lo cual se optó por utilizar cortes y hacer inmunodetección mediante un anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina en cortes de parafina.

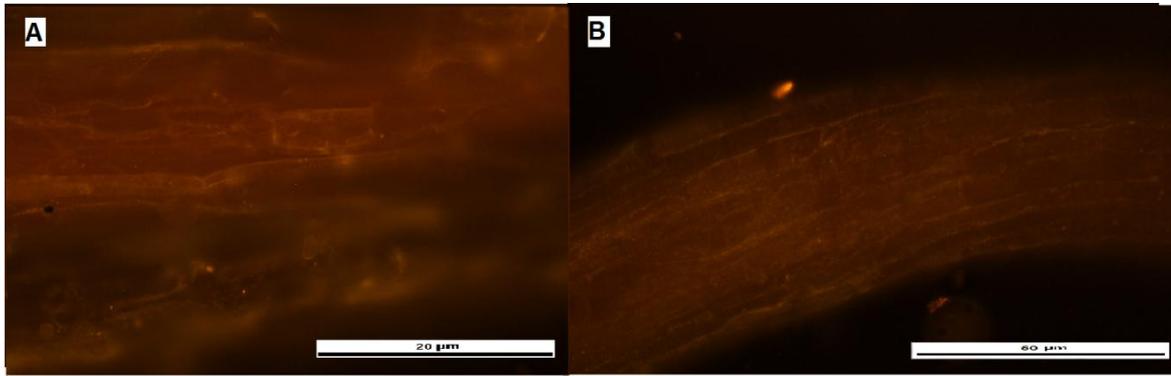


Fig. 17. (A) Inmunodetección de la proteína AtLEA4-5 con anticuerpos acoplados a Cy3 (fluorescencia) en raíces de plántulas Wt sometidas a estrés. **(B)** Como control se utilizaron raíces de plántulas que no producían la proteína AtLEA4-5 (dSpm4-5) sometidas a estrés, sin embargo se puede observar que se detecta fluorescencia de fondo muy parecida a las raíces Wt. La escala se presenta en micrómetros.

Bibliografía

- Amara I, Odena A, Oliveira E, Moreno A, Masmoudi K, Pages M y Goday A. 2011. *Insights into maize LEA proteins: From proteomics to functional approaches*. Plant & Cell Physiology. 52(2): 312-329.
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A., Campos F. y Covarrubias A.A. 2008. *The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins*. Plant Physiology. 148(1): 6–24.
- Bhatnagar-Mathur P, Vadez V y Sharma KK. 2008 *Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects*. Plant Cell Reports. 7: 411–424
- Chaves M M, Flejaz J y Pinheiro C. 2009. *Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell*. Annals of Botany. 103: 551-560.
- Colmenero-Flores J M, Moreno L P, Smith C E yCovrrubias 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 Physiology. 120(1): 93-104.
- Cutler S R, Rodriguez P L, Finkelstein R R y Abrams S R. 2010. *Abscisic acid: Emergence of a core signaling network*. Annual Review of Plant Biology. 61: 651-659.
- Dure L y Galau G A. 1981. *Developmental Biochemistry of cottonseed embryogenesis and germinacion*. Plant Physiology. 68:184-194.
- Dure L, Crouch M, Harada JJ, Ho T, Mundy J, Quatrano RS, Thomas TL y Sung ZR. 1989 *Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants*. Plant Molecular Biology 12: 475–486.
- Gao C, Wang C, Zheng L, Wang L y Wang Y. 2012. *A LEA gene regulates cadmium tolerance by mediating physiological responses*. International Journal of Molecular Sciences. 13: 5468-5481.
- Hand C S, Menze M A, Toner M, Boswell L y Moore D. 2011. *LEA proteins during water stress: Not just for plants anymore*. The Annual Review of Physiology. 73: 15.1-15.20.
- Huang G T, Liang Ma S, Bai L P, Zhang L, Ma H, Jia P, Liu J, Zhong M. y Guo Z. F. 2012. *Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants*. Molecular Biology Reports. 39: 969–987.
- Hundertmark M y Hinch D K. 2008. *LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteins and their encoding genes in Arabidopsis thaliana*. BMC Genomics. 9(118).

Kirkham, M. 2005. *Principles of soil and plant water relations*. Elsevier Academic Press. Boston.

Mahajan S y Tuteja N. 2005. *Cold, salinity and drought stresses: An overview*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 444: 139–158.

Moreno P L. 2009. *Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión*. Agronomía Colombiana. 27(2), 179-191.

Narusaka Y, Nakashima K, Shinwari Z K, Sakuma Y, Furihata T, Abe H, Narusaka M, Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. *Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses*. The Plant Journal. 34: 137-148.

Nilsen, E T. y Orcutt D M. 1996. *Physiology of plants under stress. Abiotic factors*. John Wiley and Sons, New York, NY.

Olvera-Carrillo Y, Campos F, Reyes J L, Garciarubio A y Covarrubias A A. 2010a. *Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in Arabidopsis*. Plant Physiology. 154: 373–390.

Olvera-Carrillo Y, Campos F, Reyes J L, Garciarubio A. y Covarrubias A A. 2010. *Running head: LEA proteins and adaptation to water deficit*. Plant Physiology Preview. 10:1104-1110.

Pareek A, Sopory S K, Bohnert H J y Govindjee. 2010. *Abiotic stress adaptation in plants: Physiological, molecular and genomic foundation*. Springer Science. Urbana, USA.

Pinheiro C y Chaves M M. 2011. *Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?* Journal of experimental Botany. 62 (3): 869-882.

Sauer M, Paciorek T, Bénkova E y Friml J. 2006. *Immunocytochemical techniques for whole-mount *in situ* protein localization in plants*. Nature Protocols. 1(1):98-103.

Sauter A, Davies W J y Hartung W. 2001. *The long-distance abscisic acid signal in the droughted plant: the fate of the hormone on its way from root to shoot*. Journal of Experimental Botany. 52 (363): 1991-1997.

Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaky 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.

Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaky K. 2007. *Gene networks involved in drought stress response and tolerance*. Journal of Experimental Botany. 58(2): 221-227.

Taiz L y Zeiger E. 1991. *Plant Physiology*. The Benjamin/Cuming Publishing Company. Redwood, California.

Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K y Yamaguchi-Shinozaki K. 2000. *Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions*. PNAS. 97(21): 11632-11637.

Wise M J. 2003. *LEAping to conclusions: A computacional reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles*. BMC Bioinformatics. 4(52): 1-19.

Wilson Z.A. 2000. *Arabidopsis: A practical approach*. Oxford Press. New York, USA.

Wu X, Gong F y Wang W. 2013. *Functional assignment to maize group 1 LEA protein EMB564 within the cell nucleus using computational analysis*. Biomedical Informatics. 9(6): 276-280.

Yamaguchi-Shinozaki K y Shinozaki K. 2006. *Transcriptional Regulatory Networks in Cellular Responses and Tolerance to Dehydration and Cold Stress*. The Annual Review of Plant Biology. 57: 781-803.

Páginas consultadas en internet:

<http://www.nih.gov/science/models/arabidopsis/index.html>