

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

00591

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

“ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES
CpMYB10, *CpMYB5*, Y *CpMYB7* DE *Craterostigma plantagineum*”

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

MIGUEL ANGEL VILLALOBOS LÓPEZ

CUERNAVACA, MOR., MÉXICO, 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



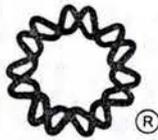
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS

MIGUEL ANGEL VILLALOBOS LÓPEZ
P r e s e n t e .

Por este conducto me permito informarle que la Comisión Académica acordó asignarle el siguiente jurado de examen para obtener el grado de Doctor en Ciencias.

Presidente:	Dr.	Omar Homero Pantoja Ayala
Secretario:	Dr.	Gabriel Iturriaga de la Fuente
Vocal:	Dra.	Georgina Hernández Delgado
Vocal:	Dra.	Svetlana Shishkova
Vocal:	Dr.	Sergio Encarnación Guevara
Suplente:	Dra.	Rosario Vera Estrella
Suplente:	Dr.	Jorge Luis Folch Mallol

Sin mas por el momento me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor. a 8 de junio 2004

Dr. Jean Louis Charli Casalonga
Coordinador de Docencia

Autografo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a través de formato electrónico e impreso en papel de 20 x 25 cm. Proceso recepcional.

Miguel Angel Villalobos
Lopez

18/06/04





PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

14 de Junio de 2004

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar
UNAM
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva:

Después de revisar cuidadosamente y de discutir la Tesis titulada:

**“Análisis de la Regulación de la Expresión de los Genes
CpMYB10, *CpMYB5*, y *CpMYB7* de *Craterostigma plantagineum*”**

del alumno **Miguel Angel Villalobos López**,

con número de cuenta 93808413 y número de expediente 30932036,

inscrito en el **Doctorado en Ciencias Bioquímicas**, considero

que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen

de grado. Por tanto emito mi **VOTO APROBATORIO** al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

Dr. Omar Homero Pantoja Ayala



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

14 de Junio de 2004

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar
UNAM
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva:

Después de revisar cuidadosamente y de discutir la Tesis titulada:

“Análisis de la Regulación de la Expresión de los Genes
CpMYB10, *CpMYB5*, y *CpMYB7* de *Craterostigma plantagineum*”

del alumno Miguel Angel Villalobos López ,

con número de cuenta 93808413 y número de expediente 30932036,

inscrito en el **Doctorado en Ciencias Bioquímicas** , considero

que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen de grado. Por tanto emito mi **VOTO APROBATORIO** al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

14 de Junio de 2004

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar
UNAM
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva:

Después de revisar cuidadosamente y de discutir la Tesis titulada:

“Análisis de la Regulación de la Expresión de los Genes
CpMYB10, *CpMYB5*, y *CpMYB7* de *Craterostigma plantagineum*”

del alumno Miguel Angel Villalobos López ,

con número de cuenta 93808413 y número de expediente 30932036,

inscrito en el Doctorado en Ciencias Bioquímicas , considero

que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen

de grado. Por tanto emito mi **VOTO APROBATORIO** al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

Dra. Georgina Hernández Delgado



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

14 de Junio de 2004

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar
UNAM
PRESENTE

Estimado Ing. Silva:

Después de revisar cuidadosamente y de discutir la Tesis titulada:

**“Análisis de la Regulación de la Expresión de los Genes
*CpMYB10, CpMYB5, y CpMYB7 de *Craterostigma plantagineum**”**

del alumno **Miguel Angel Villalobos López**,

con número de cuenta **93808413** y número de expediente **30932036**,

inscrito en el **Doctorado en Ciencias Bioquímicas**, considero

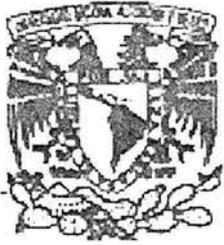
que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen

de grado. Por tanto emito mi **VOTO APROBATORIO** al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

Dra. Svetlana Shishkova



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

14 de Junio de 2004

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar
UNAM
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva:

Después de revisar cuidadosamente y de discutir la Tesis titulada:

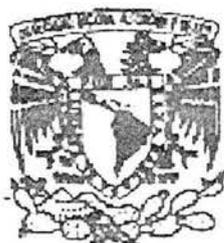
**“Análisis de la Regulación de la Expresión de los Genes
CpMYB10, *CpMYB5*, y *CpMYB7* de *Craterostigma plantagineum*”**

del alumno **Miguel Angel Villalobos López** ,
con número de cuenta **93808413** y número de expediente **30932036**,
inscrito en el **Doctorado en Ciencias Bioquímicas** , considero
que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen
de grado. Por tanto emito mi **VOTO APROBATORIO** al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

Dr. Sergio Encarnación Guevara



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

14 de Junio de 2004

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar
UNAM
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva:

Después de revisar cuidadosamente y de discutir la Tesis titulada:

“Análisis de la Regulación de la Expresión de los Genes
CpMYB10, CpMYB5, y CpMYB7 de Cratogeomys merriami”

del alumno Miguel Angel Villalobos López ,

con número de cuenta 93808413 y número de expediente 30932036,

inscrito en el **Doctorado en Ciencias Bioquímicas** , considero

que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen

de grado. Por tanto emito mi **VOTO APROBATORIO** al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

Dra. Rosario Vera Estrella



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

14 de Junio de 2004

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar
UNAM
P R E S E N T E

Estimado Ing. Silva:

Después de revisar cuidadosamente y de discutir la Tesis titulada:

**“Análisis de la Regulación de la Expresión de los Genes
CpMYB10, CpMYB5, y CpMYB7 de *Craterostigma plantagineum*”**

del alumno Miguel Angel Villalobos López ,

con número de cuenta 93808413 y número de expediente 30932036,

inscrito en el **Doctorado en Ciencias Bioquímicas** , considero

que la Tesis reúne los requisitos suficientes y la acepto para ser presentada en el examen

de grado. Por tanto emito mi **VOTO APROBATORIO** al respecto.

Agradezco de antemano la atención que se sirva prestar a la presente.

Atentamente,

Dr. Jorge Luis Folch Mallol

ÍNDICE

I.- INTRODUCCIÓN	6
I.1 El problema de la sequía	6
I.2 Estrategias adaptativas de las plantas ante la sequía	6
I.2.1 Respuestas fisiológicas de las plantas ante la sequía	8
I.2.2 Respuestas moleculares de las plantas ante la sequía	8
I.2.3 <i>Craterostigma plantagineum</i> como modelo de estudio: una planta de “Resurrección”	10
I.3 La transducción de la señal mediada por ABA	11
I.3.1 La percepción de ABA	13
I.3.2 La búsqueda de receptores de ABA	15
I.3.3 Identificación de intermediarios en la vía de transducción de ABA	16
I.3.4 Eventos primarios en la transducción de ABA	17
I.3.5 Mensajeros secundarios en la vía de ABA	21
I.3.6 Cascadas de fosforilación en respuesta a ABA	25
I.4 Factores transcripcionales involucrados en la respuesta a estrés medio ambiental	29
I.4.1 FTs tipo cierre de Leucina básico (b-ZIP)	29
I.4.2 FTs tipo B3	30
I.4.3 Homeodominio-cierre de leucina (HD-ZIP)	31
I.4.4 FTS tipo ERF/AP2	32
I.4.5 FTs tipo bHLH (antes MYC)	34
I.4.6 FTs tipo MYB	35
II.- ANTECEDENTES DEL PROYECTO	39
III.-OBJETIVOS DEL PROYECTO	43
IV.- METODOLOGIA ADICIONAL	44
V.-RESULTADOS	
IV.1 Artículo publicado de este trabajo de tesis.	48
IV.1.1 Resultados adicionales	65
IV.1.2 Análisis de la expresión de los genes <i>CpMYB5</i> y <i>CpMYB7</i>	65
IV.2.2 Clonación y análisis de la secuencia del cDNA del gen <i>CpMYB10</i>	77
IV.2.2 Estudios adicionales del efecto de la sobre-expresión de <i>CpMYB10</i> en Arabidopsis	80
VI.- DISCUSIÓN	
V.1 Cinéticas de expresión de <i>CpMYB10</i> , <i>CpMYB5</i> y <i>CpMYB7</i> en respuesta a ABA y sequía.	86
V.2 Patrones de expresión de <i>CpMYB10</i> y <i>CpMYB5</i> en hojas y raíces de <i>Craterostigma</i>	88
V.3 Los promotores de <i>CpMYB10</i> y <i>CpMYB5</i> regulan las respuestas de un gen reportero ante ABA y estrés en el fondo genético de Arabidopsis	90
V.4 <i>CpMYB10</i> es un gen de respuesta primaria	91
V.5 <i>CpMYB10</i> se une a su propio promotor y al de la LEA Cp11-24	92
V.6 La expresión ectópica de <i>CpMYB10</i> confiere fenotipos de tolerancia a estrés e insensibilidad a glucosa a plantas transgénicas de Arabidopsis	93
VII.- CONCLUSIONES	98
VIII.- PERSPECTIVAS	99
IX.- BIBLIOGRAFÍA	100

ABREVIATURAS USADAS

AAPK	“ABA-Activated Protein Kinase”
ABA	Acido Abscísico
<i>aba</i>	ABA deficient
<i>abi</i>	ABA insensitive
ABPs	ABA-Binding Proteins
ABRE	“ABA-Responsive Element”
CBF	“C-repeat binding factor”
cDNA	Ácido desoxiribonucleico complementario
cADPR	“Cyclic ADP ribose”
CDPKs	“Calcium-dependent protein kinases”
CGMP	Guanocina cíclica monofosfato
CHX	Cicloheximida
DNA	Acido desoxiribonucleico
DIG	Digoxigenina
ej.	Por ejemplo
EMSA	“Electrophoretic Mobility Shift Assay”
FT(s)	Factor(es) Transcripcional (es)
Glc	glucosa
GUS	β-glucoronidase
hr(s)	Hora(s)
H ₂ O ₂	Peroxido de hidrógeno
Kb	Kilobases
LEA	“Late Embryogenesis Abundant”
MALDI-ToF	“Matrix Assisted Lasser Desorption Ionization-Time of Flight”
min	minutos
pb	Pares de bases
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	“Reactive oxygen species
RWC	contenido relativo de agua
SnRKs	“SNF1-Related Protein Kinase”
T-DNA	DNA de transferencia
UTR	“Untranslated Región”

RESUMEN

La sequía es un grave problema que afecta a la productividad agrícola. Más de un tercio de la superficie mundial consta de zonas áridas con escasa precipitación pluvial, mientras que un 40% de las tierras de temporal de México son extremadamente áridas.

Ciertos genes vegetales se expresan durante el estrés por sequía, y sus productos ayudan a la planta a contender con los estragos causados por la pérdida de agua. Muchas de estas respuestas se encuentran controladas por la fitohormona ácido abscísico (ABA). Las plantas desarrollaron diferentes estrategias adaptativas para contender con el estrés hídrico. Algunas toleran la deshidratación a nivel protoplasmático. *Craterostigma plantagineum* es una especie que tolera la deshidratación durante largos periodos, y recupera su fisiología normal a las 24 horas de recibir agua (“resurrección”).

El grupo de investigación del Dr. Iturriaga se interesa en estudiar la vía de transducción de la señal de estrés en *Craterostigma*. Iturriaga y colaboradores (1996) aislaron tres genes que codifican factores transcripcionales tipo MYB (*CpMYB10*, *CpMYB5*, y *CpMYB7*), y presentaron evidencia que sugiere que alguno de estos responde a estrés hídrico. El alto nivel de identidad entre ellos (99-96 %) impidió el asignar las respuestas observadas a alguno de estos genes.

En esta Tesis, se analizó a mayor detalle la regulación de la expresión de los genes *CpMYB10*, *CpMYB5*, y *CpMYB7*. Los transcritos de *CpMYB10* y *CpMYB5* se acumulan desde los 15 minutos en respuesta a deshidratación y a ABA en hojas y raíces de *Craterostigma*. La expresión de *CpMYB10* y *CpMYB5* se lleva a cabo en distintos tipos celulares de hojas y raíces de *Craterostigma* tratadas con ABA, sugiriendo que estas proteínas ejercen su función en sitios diferentes. Para expresarse, *CpMYB10* no requiere de síntesis de nuevas proteínas, lo cual lo clasifica como un gen de respuesta primaria. Los promotores de *CpMYB10* y *CpMYB5* regulan la expresión de un gen reportero en respuesta a ABA y sequía en *Arabidopsis*. La proteína CpMYB10 se une a DNA específicamente en secuencias de acción en *cis* tipo MYB. La expresión ectópica de *CpMYB10* en *Arabidopsis* provoca un aumento del sistema radicular y fenotipos de tolerancia a estrés osmótico, insensibilidad a glucosa, hipersensibilidad a ABA, y alteraciones en la expresión de genes de respuesta a estrés. Los resultados obtenidos sugieren que *CpMYB10* y *CpMYB5* regulan la vía de señalización en respuesta a estrés en distintos tipos celulares, y que CpMYB10 es un factor transcripcional que regula la transcripción de genes de respuesta a estrés que permiten a la planta una mejor respuesta ante el estrés hídrico.

ABSTRACT

One third of the earth surface consists of arid or semiarid zones with poor rainfall averages, and close to 50% of the Mexican arable land is considered arid. Availability of water is probably the most limiting factor for crop productivity and yield, compromising economical output and human food supply.

Certain plant genes are expressed during drought stress and their products helps to compete with the damage caused by the water loss. Many of these responses are regulated by the hormone abscisic acid (ABA). The plants have developed several adaptative strategies to fight with drought. Some species are tolerant to dehydration at protoplasmic level. *Craterostigma plantagineum* can withstand long periods in a full dehydrated state, and revives a few hours after exposure to water (“resurrection phenomenon”).

The Dr. Iturriaga’s research group is interested in the study of the signaling pathway responding to stress in *Craterostigma*. Iturriaga and collaborators (1996) isolated three genes which codify to MYB type transcription factors (*CpMYB10*, *CpMYB5*, and *CpMYB7*), and they showed evidence suggesting that some of these genes are drought responsive. These genes share high levels of identity between them (99-96%) and very low expression levels, which hampered a precise analysis by Northern blots.

In this Thesis, a more detailed expression analysis of the *CpMYB10*, *CpMYB5*, and *CpMYB7* genes was conducted. The *CpMYB10* and *CpMYB5* transcripts accumulates since 15 minutes in response to drought or ABA treatments in both, roots and leaves of *Craterostigma*. Expression of *CpMYB10* and *CpMYB5* occurs at different cell types of roots and leaves of *Craterostigma*, suggesting that these genes exert their functions in different tissue sites. The expression of *CpMYB10* does not require *de novo* protein synthesis, which allowed classified it as a primary response gene. In *Arabidopsis*, the *CpMYB10* and *CpMYB5* promoters are able to regulate the expression of GUS in response to drought and ABA. A recombinant *CpMYB10* protein has DNA binding activity, which is specific to MYB *cis* sites. Interestingly, the ectopic expression of *CpMYB10* in *Arabidopsis* results in a more abundant root system and phenotypes of osmotic stress tolerance, glucose insensibility, ABA hypersensibility, and altered expression of drought responsive genes. These results strongly suggest that both, *CpMYB10* and *CpMYB7* are regulating the transduction pathway leading stress signaling, and also that *CpMYB10* is a transcription factor with a role in regulating the transcriptional expression of several stress responsive genes.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 EL PROBLEMA DE LA SEQUÍA

Uno de los principales factores abióticos que afectan a la productividad agrícola es la disponibilidad de agua. Más de un tercio de la superficie terrestre consta de zonas áridas y semiáridas caracterizadas por escasa precipitación pluvial y baja productividad en las plantas (Boyer J.S., 1982). A nivel mundial, los factores medioambientales tales como la sequía, salinidad, temperaturas extremas, tóxicos químicos y el estrés oxidativo, son la principal causa de pérdida de cultivos, reduciendo las cosechas en más del 50% (Boyer J.S., 1982). En muchas regiones del mundo, los problemas relacionados a la sequía y la salinidad de los suelos se han ido expandiendo debido a los cambios climatológicos y al uso excesivo de riego artificial, lo cual provocará que para el año 2050 mas de la mitad de las tierras de cultivo se vean seriamente afectadas (Bray *et al.* 2000).

Particularmente en México, la distribución de los recursos hidráulicos es un grave problema, ya que en un 79% de las tierras cultivables la precipitación pluvial es calificada de irregular a deficiente, y de esta superficie de temporal el 41% es de extrema aridez (Molina J., 1979). Por otro lado, la irrigación es un recurso cada vez más usado y está contribuyendo progresivamente a la salinización de nuestros suelos. Es por estas razones que el estudio de los efectos del déficit hídrico en las plantas, la caracterización de los mecanismos de respuesta y adaptación, y la manipulación genética para lograr incrementos a la tolerancia al estrés hídrico, debieran ser de interés fundamental para países como el nuestro.

I.2 ESTRATEGIAS ADAPTATIVAS DE LAS PLANTAS ANTE LA SEQUÍA

Evolutivamente, las plantas han desarrollado una serie de adaptaciones fisiológicas, morfológicas, y metabólicas para contender con la falta de agua. Los mecanismos más complejos se expresan al nivel del desarrollo e implican la interacción de una multitud de productos genéticos. Los mecanismos más simples se expresan al nivel metabólico y pueden involucrar la participación de unos cuantos productos genéticos (McCue y Hanson, 1990).

Las estrategias adaptativas que algunas plantas han desarrollado para contender con la sequía son: el “escape”, la “evasión” y la “tolerancia” a la sequía. El escape consiste en acortar el ciclo de vida de la planta de manera que coincida con la estación de lluvias, evitándose la sequía, y de esta manera no se expone a que disminuya el crecimiento y baje el rendimiento de la planta. En la evasión, la planta mantiene un estatus hídrico constante debido a las adaptaciones morfofisiológicas que presenta, tales como la ausencia de hojas y presencia de espinas, una cutícula cerosa, parénquima esponjoso, raíces de gran longitud; y el metabolismo del carbono tipo C4 ó CAM, como es el caso de los cactus y los agaves.

Por último, la tolerancia protoplasmática a la sequía provee a las plantas de la capacidad de sobrevivir en un estado de deshidratación total, aún por periodos de años, para continuar su desarrollo al rehidratarse en unas horas. Solo unas cuantas plantas poseen tejidos vegetativos tolerantes a la deshidratación; estas incluyen a un pequeño grupo de angiospermas, llamadas plantas de “resurrección” (Gaff, 1971), y también algunos helechos, algas, líquenes, y briofitas. Sorprendentemente, algunas de estas especies pueden equilibrar sus hojas aún en ambientes con 0 % (v/v) de humedad relativa. Las plantas de resurrección suelen ser poikilohídricas, es decir, su contenido de agua interno varía con respecto a la humedad relativa del ambiente. El nicho ecológico de las plantas de resurrección suele cubrir regiones con una disponibilidad de agua limitada por las estaciones climáticas, y crecen preferentemente sobre pequeñas elevaciones rocosas (“inselbergs”) en zonas tropicales y subtropicales (Porembski y Barthlott, 2000).

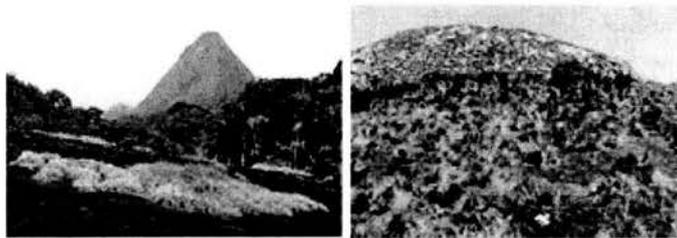


Fig. 1. Ejemplos de inselbergs. Este tipo de formaciones rocosas se caracterizan por condiciones medioambientales extremas y poseen una vegetación que es marcadamente distinta a la de sus alrededores. De esta manera, los inselbergs constituyen centros de diversidad de plantas vasculares tolerantes a la deshidratación (tomado de Porembski y Barthlott, 2000).

I.2.1 RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE LAS PLANTAS ANTE LA SEQUÍA

Cuando una planta sufre déficit hídrico, se dispara una respuesta que involucra una serie de cambios a nivel fisiológico y bioquímico. Ante un estrés por sequía, a nivel de la planta completa se observa una disminución en la presión del turgor y consecuentemente marchitez, reducción en la tasa de fotosíntesis como producto del cierre de los estomas, y reducción en la velocidad de crecimiento de la parte aérea de la planta, respecto a la velocidad de crecimiento de la raíz. El efecto prolongado de todas estas alteraciones provoca la pérdida parcial o total de los cultivos (Bonhert y Jensen, 1996).

Durante el estrés por sequía, muchas plantas responden disminuyendo su potencial de agua por acumulación de osmolitos, tales como disacáridos, polioles, aminas cuaternarias y aminoácidos. A esta respuesta se le conoce como ajuste osmótico. El ajuste osmótico es la principal señal involucrada en mantener la presión del turgor, la cual es de suma importancia para el control del crecimiento celular y responsable en gran medida de la rigidez mecánica de los tejidos vegetales. Por lo tanto, los efectos de un déficit de agua sobre el crecimiento de las plantas son atribuidos a la pérdida de turgor (Bray E.A., 1993; Bohnert *et al.*, 1995).

I.2.2 RESPUESTAS MOLECULARES DE LAS PLANTAS ANTE LA SEQUÍA

Además, durante el estrés hídrico u osmótico se produce una síntesis de novo de ARN mensajeros y de ciertas proteínas, secuestro y entrada de iones, recambio de proteínas y modificación de membranas, entre otros (Bray E.A., 1993). Estos cambios son el resultado de la expresión de algunos genes que permiten la adaptación de la planta a las nuevas condiciones ambientales. Sin embargo, la expresión de estos genes no significa que ellos sean los que confieran la tolerancia al estrés, sino que algunos forman parte de la respuesta al daño causado por el estrés (Ingram y Bartels, 1996).

Una de las respuestas a la deshidratación mejor caracterizadas a nivel molecular es la síntesis de proteínas abundantes de la embriogénesis tardía (LEA). Las proteínas LEA se sintetizan durante la etapa tardía del desarrollo del embrión en las semillas de las plantas superiores. Estas proteínas también se expresan en el tejido vegetativo cuando existen condiciones ambientales de estrés hídrico, osmótico o bajas temperaturas. En la planta de resurrección *C. plantagineum*, las proteínas LEA también se acumulan en respuesta al estrés hídrico (Bartels *et al.*, 1990; Piatkowski *et al.*, 1990). Las características

comunes de estas proteínas es que son altamente hidrofílicas, no contienen residuos de cisteína ni triptófano y son de bajo peso molecular. Se ha postulado en base a su estructura, que la función de las LEAs es osmoprotectora, probablemente ligada a la retención del agua citoplasmática, en la preservación de la estructura de las proteínas así como en el secuestro de iones durante la deshidratación, en la preservación de la estructura de la membrana o bien reemplazando a las moléculas de agua que se pierden durante la deshidratación. La regulación de los genes que codifican a las LEAs se lleva a cabo a nivel transcripcional, y se inducen en presencia de la hormona vegetal ácido abscísico (ABA) (Bray E.A., 1993; Ingram y Bartels, 1996).

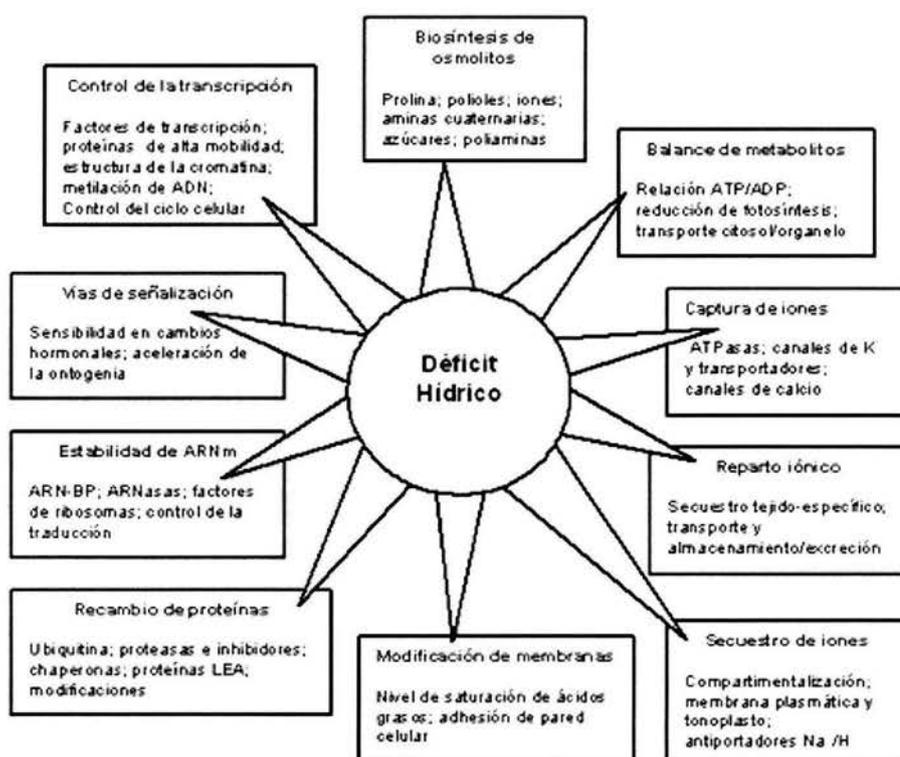


Fig. 2. Respuestas de las plantas al déficit hídrico. Los cambios fisiológicos, bioquímicos y moleculares ayudan a la planta a mantener el metabolismo y restauran las condiciones que permiten el crecimiento bajo estrés (modificado de Bohnert *et al.*, 1995).

I.2.3 *CRATEROSTIGMA PLANTAGINEUM* COMO MODELO DE ESTUDIO: UNA PLANTA DE “RESURRECCIÓN”.

Craterostigma plantagineum es una dicotiledónea cuyo hábitat natural se restringe a algunas regiones del desierto sudafricano (Gaff, 1971). El atractivo de *C. plantagineum* como un modelo de estudio reside principalmente en que su tolerancia a la deshidratación se manifiesta tanto en tejidos vegetativos como también en callos indiferenciados cultivados *in vitro*. Esto permite comparar la expresión de genes en dos sistemas con el mismo fondo genético, evitando así el efecto del estado de desarrollo cuando, por ejemplo, se estudia la adquisición de tolerancia a deshidratación durante el desarrollo de la semilla. Los callos obtenidos de *Craterostigma* solo adquieren la tolerancia cuando son cultivados en presencia de ABA (Bartels *et al.*, 1990). En callos, el ABA induce la expresión de un grupo de RNAs mensajeros que mantienen cierta equivalencia con los que normalmente se inducen en respuesta a sequía en la planta completa. Además de los estudios moleculares descritos en *C. plantagineum*, esta planta se puede transformar genéticamente mediante *Agrobacterium tumefaciens* (Furini *et al.*, 1994), y también se pueden realizar estudios de expresión usando protoplastos o biobalística (Bartels y Salamini, 2001).



Figura 3. El fenómeno de la resurrección en *Craterostigma plantagineum*. A, Plantas de *Craterostigma* en su hábitat natural en Kenia. B, Efecto de la deshidratación: planta hidratada, deshidratada, y la misma planta rehidratada por 12 hrs. C, Efecto en callos, de izquierda a derecha: callos sin tratar, callos tratados con ABA de 0 a 7 días, los mismos callos sometidos a deshidratación, para finalmente ser rehidratados (modificado de Bartels y Salamini, 2001).



Los estudios con *C. plantagineum* han mostrado que el estado fisiológico de la planta previo a la deshidratación es importante para la sobrevivencia. Estas plantas solo desarrollan la capacidad de sobrevivir a la deshidratación si la pérdida de agua es lenta, lo cual le da el tiempo suficiente para adaptar su metabolismo al activar un programa específico de expresión génica. La mayoría de los cambios en la expresión de genes ocurre durante el proceso de deshidratación, mientras que unos cuantos cambios se observan durante la etapa de rehidratación. Precisamente, se han aislado muchos de estos genes cuya expresión es inducida por sequía, pero muy pocos inducidos por rehidratación han sido identificados hasta el momento (Bernachia *et al* 1996). Esto contrasta con las observaciones hechas en el musgo *Tortula ruralis*, un representante de las briofitas tolerantes a sequía, el cual logra sobrevivir a deshidrataciones rápidas. Para este musgo, los cambios más importantes de expresión génica ocurren durante las primeras hrs de la rehidratación (Wood y Oliver, 1999). A diferencia de *C. plantagineum*, los cambios de expresión génica en respuesta a deshidratación y rehidratación están regulados a nivel traduccional en *T. ruralis*, ya que existe un cambio en el grupo de RNAs seleccionados para ser traducidos a proteínas a partir de una poza relativamente constante de RNA presente en ambos estados fisiológicos. Este hecho apoya la idea de que la tolerancia a deshidratación en briofitas difiere a la de *C. plantagineum* en ser una respuesta de reparación celular inducida por sequía.

La deshidratación en *C. plantagineum* provoca una alteración de su contenido de carbohidratos, un incremento en su contenido de ABA y en los procesos relacionados a la fotosíntesis, cambios en la estructura subcelular, además del cambio en expresión génica ya mencionado. Esta planta reacciona desde las primeras 2 hr de deshidratación, y los cambios metabólicos se inician mucho antes de que se presenten los primeros signos de marchitez. Todos estos cambios inducidos por la deshidratación son revertidos durante el proceso de rehidratación (Bartels y Salamini, 2001).

I.3 LA TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL MEDIADA POR ABA

La fitohormona ácido abscísico (ABA) es ubicua tanto en plantas inferiores y superiores, y en todas ellas parece estar regulando el mismo tipo de procesos. Al ABA también lo producen algunos hongos fitopatógenos, y curiosamente se ha encontrado también en el cerebro de algunos mamíferos (Finkelstein y Rock, 2002). El ABA es un ácido débil 15-C ópticamente activo que fue identificado por primera vez a principios de la década de los 60s como un inhibidor que se acumula en frutas de algodón

en abscisión (“abscisina II”), y también en hojas del árbol sicómoro con dormancia inducida por fotoperíodo (“dormina”) (Finkelstein y Rock, 2002).

En realidad, el ABA normalmente se encuentra involucrado en la regulación de una variedad de eventos. Entre otras cosas, ABA regula la maduración del embrión y la dormancia de la semilla, además de promover el cierre de los estomas. El ABA ha sido llamado la hormona del estrés, ya que ésta aumenta la adaptación a varios estreses, tales como bajas temperaturas, radiación por UV, patógenos, salinidad y durante la respuesta de la planta al déficit de agua (Giraudat *et al.*, 1994; Giraudat, 1995; Leung y Giraudat, 1998; Finkelstein *et al.*, 2002). Sin embargo, a pesar de su nombre, el ABA no parece controlar directamente el proceso de abscisión; en realidad, la presencia de ABA en órganos en abscisión es un reflejo de su papel en eventos precedentes a la abscisión, como son la promoción de senescencia y/o respuestas al estrés. A pesar de que durante muchos años se pensó en el ABA como un inhibidor del crecimiento, los tejidos jóvenes de las plantas tienen altos niveles de ABA en comparación con tejidos adultos (Finkelstein y Rock, 2002). Además, mutantes deficientes en la síntesis de ABA (mutantes *aba*) se encuentran severamente mal desarrolladas (enanas) debido al desacoplamiento entre la reducción de transpiración y el control del turgor (Finkelstein y Rock, 2002). La aplicación exógena de ABA a las mutantes *aba* normaliza la expansión celular y el crecimiento (Finkelstein y Rock, 2002).

A la fecha, todas las mutantes *aba* aisladas son pleiotrópicas (de hecho, solo una de cuatro mutantes fue identificada en un tamizado basado ABA), y lamentablemente no se han identificado mutantes involucradas en el catabolismo o con fenotipos ABA-*null* (Finkelstein y Rock, 2002). Se piensa que el metabolismo de ABA se encuentra regulado por retroalimentación, ya que muchas mutantes *abi* (insensibles a ABA) presentan niveles alterados de ABA mientras que algunos genes de la biosíntesis de ABA se encuentran regulados por esta. Estas observaciones sugieren que los procesos involucrados en la homeostasis de ABA son muy complejos. La redundancia genética podría sumarse a esta complejidad, pero se conoce muy poco sobre la regulación del metabolismo de ABA, su especificidad de tejido, o su compartamentación subcelular. Existe evidencia sólida que sugiere que la manipulación de la biosíntesis y/o señalización de ABA puede conferir adaptación al estrés en plantas transgénicas, y también que la homeostasis de ABA es parte de una compleja red hormonal que funciona integrando señales del medioambiente y los programas de desarrollo de la planta (Chory y Wu, 2001).

Debido a que el ABA es un sesquiterpenoide, durante mucho tiempo se pensó que se sintetizaba directamente a partir de farnesilfosfato, como ocurre en los hongos. Sin embargo, ahora sabemos que el ABA se sintetiza indirectamente a partir de carotenoides. El ABA ($C_{15}H_{20}O_4$) tiene un átomo de carbono

asimétrico que es activo ópticamente (C-1'). La forma más común en la naturaleza es S-(+)-ABA; la cadena lateral de ABA es por definición 2-*cis*,-4-*trans*. La forma *trans-trans* de ABA es biológicamente inactiva. Debido a su naturaleza de ácido débil (pKa=4.8), el ABA mayoritariamente se encuentra sin carga cuando está presente dentro del ambiente relativamente ácido del compartimiento apoplástico de las plantas, y puede entrar fácilmente a las células a través de la membrana plasmática. El concepto de captura de aniones se aplica para explicar la distribución del ABA entre los compartimentos celulares: la forma disociada (anión) de este ácido débil se acumula en compartimentos alcalinos (ej. cloroplastos iluminados) y se podría redistribuir de acuerdo a los niveles de los gradientes de pH a través de las membranas. Adicionalmente, podrían existir acarreadores específicos ABA para mantener una baja concentración de ABA en el apoplasto en plantas sin estrés (Finkelstein y Rock, 2002).

La regulación de los procesos fisiológicos controlados por ABA ocurre principalmente al nivel de la biosíntesis, y su subsiguiente catabolismo. Esto requiere síntesis *de novo* de enzimas importantes del metabolismo de ABA, más que una redistribución de reservas de ABA preexistentes, aunque el transporte de ABA a través del xilema es una señal que viaja de la raíz al tallo en respuesta a la sequía (Zeevaart y Creelman, 1988; Finkelstein y Rock, 2002).

De esta manera, una de las primeras respuestas de las plantas al déficit de agua es un rápido aumento en los niveles de ABA. En varias especies vegetales se han aislado mutantes deficientes en la síntesis de ABA (mutantes *aba*). La caracterización de estas mutantes, en conjunción a estudios bioquímicos, ha permitido que actualmente se conozca la ruta de biosíntesis de ABA y los genes involucrados (Schwartz *et al.*, 2003). La biosíntesis de ABA inicia dentro de los cloroplastos a partir de un precursor derivado de los carotenoides, la zeaxantina, y termina en el citoplasma donde puede ser llevado a cabo su función o bien ser catabolizado (Cutler y Krochko, 1999; Schwartz *et al.*, 2003).

Varios grupos de investigación se han dado a la tarea de entender el mecanismo(s) por medio del cual se lleva a cabo la percepción de ABA en las plantas, utilizando como modelo la regulación de la apertura de estomas. Hasta la fecha, no se ha caracterizado el (los) receptor (es) de ABA, aunque se han presentado evidencias que sugieren la presencia de al menos dos sitios de reconocimiento de ABA, uno situado en la membrana plasmática, y otro localizado intracelularmente. Se ha propuesto que el receptor (es) interno (os) se encuentra (an) regulando a canales iónicos del tonoplasto para la liberación de iones vacuolares, mientras que el receptor(es) externo (os) se encuentra (an) mediando la estimulación del eflujo de iones en la membrana plasmática (MacRobbie EAC, 1995a, MacRobbie EAC, 1995b).

I.3.1 LA PERCEPCIÓN DE ABA.

Después de llegar a su sitio de acción, se espera que el primer paso de la respuesta a ABA sea algún tipo de evento de reconocimiento. A partir de dos evidencias indirectas se ha sugerido que podrían existir múltiples tipos de receptores: la estereoespecificidad de las actividades mostradas por análogos de ABA, y que aparentemente existen sitios tanto extra como intracelulares para el reconocimiento de ABA (Finkelstein y Rock, 2002). A pesar de todo, a la fecha no se ha identificado ningún receptor de ABA.

El sitio de acción de ABA se ha estudiado desde varias estrategias: midiendo las respuestas celulares al ABA introducido vía microinyección, aplicando ABA exógeno a distintos pH para modular su entrada, o bien aplicando conjugados de ABA/proteínas para prevenir su entrada. Las evidencias iniciales que apoyan la existencia de un receptor intracelular de ABA en la regulación del estoma vienen de las siguientes observaciones: (1) la duración de la inhibición de la apertura del estoma mediada por ABA fue directamente proporcional a la entrada de ABA radioactivo; (2) La microinyección de ABA dentro del citoplasma de células guarda provoca el cierre del estoma; y (3) utilizando el electrodo de “patch-clamp” para aplicar ABA al citosol de protoplastos de células guarda se provoca la inhibición de las corrientes de entrada de K^+ , lo cual consecuentemente impide la apertura del estoma (Schwartz *et al.*, 1994). De manera parecida, Allan *et al.* (1994) mostraron que los estomas se cierran después de haberse liberado intracelularmente el ABA “caged” que fue microinyectado. Otros estudios han mostrado que además, ABA tienen un efecto sobre el flujo de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática de células guarda, ya que cuando se adiciona ABA al lado citosólico de la membrana (“inside-out patches”) se provoca una rápida activación de los canales de Ca^{2+} , mientras que la aplicación sobre la cara externa de la membrana provoca un retraso significativo en la activación de los canales de Ca^{2+} (Hamilton *et al.*, 2000). Estos estudios sugieren la existencia de un reconocimiento de ABA en el lado citoplásmico de la membrana plasmática, además de una estrecha asociación entre el receptor de ABA y los canales Ca^{2+} .

Por otro lado, varios estudios han sugerido que por si solo el ABA intracelular no es suficiente para inhibir la apertura del estoma, lo cual indicaría la existencia de un receptor extracelular. Tanto Anderson *et al.* (1994) como MacRobie (1995b) observaron un efecto mucho mayor en el cierre del estoma cuando se aplica ABA exógenamente a pH 6.15 que cuando se aplica a pH 8. Como se mencionó anteriormente, para poder atravesar la membrana plasmática el ABA (un ácido débil) debe encontrarse en una forma protonada (+/- pH 6), ya que la forma aniónica (+/- pH 8) es incapaz de atravesarla. Se han reportado evidencias mas directas sobre la existencia de un sitio de percepción de ABA extracelular. Por

ejemplo Gilroy y Jones (1994) reportaron que en protoplastos de aleurona de cebada, la aplicación exógena de ABA, pero no así la microinyección de esta, reprime la inducción del gen α -amilasa dependiente de la fitohormona ácido giberélico (GA). La percepción extracelular de ABA también se observó en dos estudios donde utilizan conjugados ABA-proteína que son incapaces de atravesar la membrana plasmática pero mantienen su actividad biológica, ya que pueden inducir la actividad de canales iónicos (Jeannette *et al.*, 1999) o bien regular expresión génica (Schultz y Quatrano, 1997; Jeannete *et al.*, 1999). Recientemente se utilizó ABA biotinilada como sonda para estudiar sus sitios de unión en protoplastos de células guardia de *Vicia faba* (Yamazaki *et al.*, 2003). Los autores primero demuestran que el ABA biotinilada posee actividad biológica ya que esta molécula induce el cierre del estoma. Utilizando microscopia de fluorescencia y confocal, los mismos autores muestran además que existe un reconocimiento extracelular de esta molécula, en sitios muy definidos de la superficie de protoplastos de células guardia, y que el pre-tratamiento de los protoplastos con proteinasa K bloquea la unión de ABA (Yamazaki *et al.*, 2003).

Todos los datos anteriores son consistentes con la idea de que existen ambos receptores: intra y extracelulares. Si embargo, podrían existir otra interpretaciones de esta observaciones, por ejemplo, la acción directa de ABA en las membranas plasmática y del tonoplasto (o canales iónicos) desde el lado citoplasmático, ó la existencia de un receptor de ABA con mayor afinidad a la forma protonada, ó bien vías dependientes de pH (Finkelstein *et al.*, 2002).

I.3.2 LA BUSQUEDA DE RECEPTORES DE ABA.

El uso de análogos de ABA en experimentos de germinación y expresión génica ha sugerido la existencia de múltiples receptores de ABA con diferentes requerimientos estructurales para funcionar en diferentes vías de respuesta (Walker-Simmons *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 1999). Mas aún, la rápida regulación de las actividades de los canales iónicos tanto de la membrana plasmática y del tonoplasto (Assmann y Shimazaki, 1999), podría reflejar la interacción de ABA y proteínas de transporte u otros factores metabólicos (ej. vía sitios alostéricos para la unión de ABA). De acuerdo a lo anterior, la búsqueda de receptores de ABA debe incluir compartimentos tanto intra como extracelulares, además de moléculas no proteicas. Para la búsqueda de receptores resulta crítico el uso de análogos de ABA para poder correlacionar la especificidad de la interacción con el grado de actividad biológica.

A diferencia de lo ocurrido en los estudios de señalización de etileno y citocininas, en el caso de ABA ha fallado el uso de estrategias genéticas para identificar algún probable receptor. Consecuentemente, los progresos mas grandes se han realizado usando estrategias bioquímicas y biológicas. A pesar de que no se ha reportado un receptor para ABA, si se han reportado varias proteínas que se unen a ABA con alta afinidad (ABPs, ABA-Binding Proteins). En *Vicia faba* se reportó la presencia de ABPs tanto en fracciones de membrana (Hocking *et al.*, 1978) así como también en el plasmalema de células guarda (Hornberg y Weiler, 1984). En *Arabidopsis* también se identificó una ABP en fracciones microsomales (Pedron *et al.*, 1998); otra ABPs se identificó en el citosol de la pulpa en desarrollo de las manzanas (Zhang *et al.*, 2001). Otra proteína de unión a ABA se purificó a partir de la epidermis de hojas de frijol ancho (Zhang *et al.*, 2002). Recientemente, se reportó el aislamiento y caracterización de ABAP1, una ABP que se aisló utilizando la estrategia de anticuerpos anti-idiotípicos a partir de un banco de cDNA de aleurona de cebada tratada con ABA (Razem *et al.*, 2004). ABAP1 presenta las características propias de un receptor: reversibilidad, saturabilidad, y alta afinidad de unión (Razem *et al.*, 2004); sin embargo queda por demostrar el efecto *in vivo* de ABAP1 para poder designarla como receptor de ABA.

I.3.3 IDENTIFICACIÓN DE INTERMEDIARIOS EN LA VÍA DE TRANSDUCCIÓN DE ABA

Hasta el momento, se han aislado docenas de mutantes con defectos en la respuesta, y la gran mayoría de estas mutantes han sido obtenidas en *Arabidopsis*. Las estrategias que se han utilizado para aislar mutantes en la vía han sido de lo mas diversas: a) selección de semillas vivíparas o con defectos en su germinación (Robertson, 1955); Sturaro *et al.*, 1996); b) selección de líneas con niveles de transpiración altos lo cual resulta en la disminución de la temperatura interna en las hojas (Raskin y Ladyman, 1988); c) tolerancia a la deshidratación independiente de ABA en células cultivadas (Furini *et al.*, 1997); d) desarrollo embrionario con alteraciones (Meinke *et al.*, 1994); e) pérdida o ganancia en la sensibilidad a ABA durante la germinación (Koornneef *et al.*, 1984; Finkelstein 1994; Cutler *et al.*, 1996), o durante el crecimiento de la raíz (Himmelbach *et al.*, 1998); f) expresión incorrecta de genes reporteros (Ishitani *et al.*, 1997; Foster y Chua, 1999; Delseny *et al.*, 2001); y g) búsqueda de “enhancers” supresoras de las líneas mutantes GA-deficientes o *abi* (Steber *et al.*, 1998; Beaudoin *et al.*, 2000; Ghassemian *et al.*, 2000). Varios de estos loci han sido clonados y sus productos incluyen una

variedad de factores de transcripción, proteínas de unión a RNA, proteínas cinasas y fosfatasas, una enzima del metabolismo de fosfoinosítidos, y una subunidad de farnesiltransferasa (Finkelstein *et al.*, 2002).

Utilizando otro tipo de tamizados que no se basaron en ABA, se han aislado otras mutantes defectuosas en sus respuestas a múltiples señales, entre ellas ABA. Por ejemplo, se han utilizado tamizados seleccionando líneas mutantes resistentes a NaCl (Quesada *et al.*, 2000), selección de plántulas resistentes a glucosa (Arenas-Huertero *et al.*, 2000; Huijser *et al.*, 2000; Laby *et al.*, 2000; Rook *et al.*, 2001), o bien líneas mutantes defectuosas en sus respuestas a auxina, brasinosteroides, o etileno (Wilson *et al.*, 1990; Alonso *et al.*, 1999; Ephritikhine *et al.*, 1999) (Tabla 1). El hecho de que algunos de estos loci de respuesta a hormonas parecen estar regulando varias vías de señalización sugiere que existe una interacción entre estas vías.

I.3.4 EVENTOS PRIMARIOS EN LA TRANSDUCCIÓN DE ABA.

A partir de estudios farmacológicos y bioquímicos, ahora se sabe que en los eventos primarios de señalización en respuesta a ABA participan tanto proteínas G, así como también fosfolipasas, proteínas cinasas y proteínas fosfatasas (Rock, 2000; Assmann, 2002; Yang, 2002). Debido a que los tipos de proteínas antes mencionados podrían participar en una amplia gama de eventos de señalización, existen muchas preguntas sobre la manera en que se regula la especificidad de respuesta a ABA. Es probable que algún miembro de una familia abundante de proteínas tuviera un papel especializado dentro de la vía. Sin embargo, *Arabidopsis* posee solamente 1 o dos isoformas de cada subunidad de proteína G, lo cual representa por lo menos un orden de magnitud por debajo del número de isoformas presentes en los genomas de animales (Finkelstein *et al.*, 2002). Al menos dos estudios han mostrado que la pérdida de función del gen único *Ga* (*GPA1*) provoca la disrupción de varios aspectos de la señalización de ABA y de auxinas, lo cual indica que este componente no es una fuente probable de especificidad (Ullah *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001).

Existen distintas clases de GTPasas en plantas: proteínas G pequeñas, proteínas G heterotriméricas (grupo al que pertenece la subunidad *GPA1* antes mencionada), y probablemente existan también otros tipos de proteínas de unión a GTP que no caen dentro de las características de las clase antes mencionadas (GTPasas no convencionales) (Assmann, 2002).

Las proteínas G heterotriméricas de mamíferos son GTPasas compuestas por las subunidades α , β y γ . De manera clásica, estas GTPasas están asociadas con receptores de membrana plasmática que contienen siete dominios transmembranales conocidos como receptores heptahélicos, receptores 7-TMS, o Receptores Acoplados a Proteínas G (GPCRs). La activación del receptor provoca a su vez la activación de la proteína G mediante el cambio de GDP a GTP como nucleótido de unión por parte de la subunidad $G\alpha$. Posteriormente $G\alpha$ y/o $G\beta\gamma$ interactúan con otras proteínas efectoras. Eventualmente, la actividad GTPasa endógena de la subunidad $G\alpha$ regresa a su estado inactivo que es la forma unida a GDP, y después de esto el trímero se reasocia (Assman, 2002). Una breve lista de efectores de la subunidad $G\alpha$ en mamíferos: adenilato ciclasa, fosfodiesterasa de GMP cíclico, fosfoinositido 3-cinasa, fosfoinositido fosfolipasa $C\beta$ (PI-PLC β), fosfolipasa D, transportadores de intercambio de Na^+/H^+ , factores transcripcionales (FTs), y canales de K^+ , Ca^{2+} , Cl^- , Na^+ . A su vez, los blancos de las subunidades $G\beta\gamma$ incluyen: fosfolipasa A2, canales de Ca^{2+} , y algunas isoformas de PI-PLC β y de adenilato ciclasa (Assmann, 2002). Como se mencionó anteriormente, en las plantas también se han identificado proteínas G heterotriméricas. *GPA1* es un gen único en Arabidopsis, aunque en algunas especies poliploides, como la soya, se han identificado al menos dos genes relacionados a *GPA1*. El gen *GPA1* codifica para la subunidad $G\alpha$ en plantas. Una mutación por inserción de T-DNA en *GPA1* provoca que ABA no pueda inhibir los canales de entrada de K^+ en células guarda, además de inhibir la activación de canales aniónicos mediada por ABA de manera independiente del pH (Wang *et al.*, 2001). La mutante *gpa1* también presenta insensibilidad a ABA en el control de la apertura del cierre de los estomas, provocando así que la pérdida de agua sea mayor en la mutante que en las plantas silvestres (Wang *et al.* 2001). Por otro lado, se ha visto que al igual que en los mamíferos, en las plantas el metabolito de los esfingolípidos conocido como esfingosina-1-fosfato (S1P) funciona como un mensajero intracelular y como un ligando extracelular acoplado a proteínas G (Coursol *et al.*, 2003). Además, se ha descubierto que S1P es una molécula señalizadora del estrés por sequía que participa en la regulación mediada por ABA del turgor de las células guarda (Ng *et al.*, 2001). En Arabidopsis, la enzima encargada de producir S1P (esfingosina cinasa SphK) se activa por ABA, y además esta enzima participa en la inhibición de la apertura del estoma y en la promoción del cierre del estoma, ambos procesos regulados por ABA. Asimismo, la inhibición de SphK resulta en una atenuación de la regulación por ABA de los canales de entrada de K^+ y de los canales aniónicos lentos, dos procesos implicados en la regulación del tamaño del poro del estoma. Adicionalmente, S1P puede regular tanto las aperturas del estoma como las actividades de los canales iónicos de células guarda en plantas silvestres, pero es incapaz de lograrlo en las células

guarda de una mutante en *GPA1* (Coursol *et al.*, 2003). En conjunto, en todos estos casos se involucran a las proteínas G heterotriméricas como elementos que participan corriente abajo en la vía de señalización de SIP, que a su vez modula el estado de la apertura del estoma que es regulado por ABA.

El otro tipo de GTPasas, conocidas como GTPasas pequeñas, poseen masas de entre 21 a 30 kD, son proteínas monoméricas que se unen al nucleótido guanina, y se relacionan evolutivamente con la subunidad α de las proteínas G heterotriméricas. Las GTPasas pequeñas se agrupan en una gran superfamilia de proteínas cuyos miembros comparten varias características estructurales, incluyendo cuatro dominios de unión a guanina y un dominio de unión al efector (Yang, 2002). Sin embargo, las GTPasas pequeñas también exhiben una diversidad considerable, tanto en estructura como en función. Las GTPasas pequeñas difieren de las heterotriméricas en la forma en que son reguladas por factores corriente arriba, y también en los mecanismos empleados al activar a los factores corriente abajo. Una vez que el estímulo ha llegado, el factor de intercambio de guanina (GEF) convierte a la forma inactiva (unida a GDP) en la forma activa unida a GTP mediante el reemplazamiento de los nucleótidos. A través de su dominio efector, la forma activa puede interactuar con una ó varias proteínas efectoras. Por sí sola, la forma activa posee una actividad GTPasa muy débil para la hidrólisis de GTP, y es por esto que la GTPasa requiere de la participación de una proteína activadora (GAP). Además, dependiendo del momento, las GTPasas pequeñas se encuentran ciclando entre la forma unida a membrana y la forma citosólica. Solamente las GTPasas asociadas a membrana pueden ser activadas por GEF, y esta forma de membrana es regulada negativamente por un factor citosólico llamado inhibidor de disociación (GDI). Aparentemente, estos complejos mecanismos de regulación y acción de las GTPasas pequeñas se encuentran conservados en todos los organismos, incluyendo a las plantas. A pesar de su pequeño tamaño, la capacidad de interacción de las GTPasas pequeñas con varios reguladores y efectores, genera una gran diversidad funcional y es capaz de crear funciones novedosas (Yang, 2002). Se ha calculado que el genoma de *Arabidopsis* posee al menos 93 diferentes genes que codifican para este tipo de proteínas. Las GTPasas pequeñas de *Arabidopsis* podrían regular a toda una multitud de eventos, desde el tráfico de vesículas hasta la señalización hormonal (Yang, 2002). A diferencia de lo que ocurre en los mamíferos donde el número es elevado, el pequeño número de genes que en las plantas codifican para las subunidades de las proteínas G heterotriméricas podría significar que durante la evolución de las plantas las GTPasas pequeñas surgieron como “switches” moleculares para la señalización (Yang, 2002). En general, la superfamilia de las GTPasas pequeñas se clasifican en cinco familias: Ras, Rho, Rab, Arf, y Ran. A pesar de estar presentes en *Arabidopsis*, los miembros de las familias Rab, Arf, y

Ran participan en procesos esenciales para el funcionamiento de la célula, y es por esto que no se consideran como proteínas de señalización que transmitan señales extracelulares. En mamíferos, las familias Ras y Rho sí son reconocidas como proteínas *bona fide* de señalización que responden a estímulos medioambientales, aunque dentro del genoma de *Arabidopsis* solo han sido encontrados miembros de la familia Rho. El análisis filogenético de los miembros de la familia Rho en *Arabidopsis*, indica que todos ellos caen dentro de una subfamilia única denominada ROP. Existen al menos 11 miembros de la subfamilia ROP en *Arabidopsis*. En las plantas, a las proteínas de la subfamilia ROP se le ha encontrado participando en toda una variedad de procesos: control del crecimiento del tubo polínico, regulación del desarrollo de los pelos radiculares, expansión celular de tejidos en desarrollo, regulación de la producción del segundo mensajero H_2O_2 , y regulación negativa de las respuestas a ABA. De entre los miembros de la subfamilia ROP, solo ROP9 y ROP10 contienen un motivo probable para farnesilación, y los restantes poseen motivos para geranilgeranilación, ó bien carecen de motivos de prenilación. La función de las proteínas ROPs se ha estudiado mediante la expresión transgénica de mutantes tanto constitutivamente activas (CA), así como también dominantes negativas (DN). Estos estudios han implicado a ROP2 y a ROP6 (ambos sujetos a geranilgeranilación) en la regulación negativa de las respuesta a ABA (Li *et al.*, 2001; Lemichez *et al.*, 2001). Sin embargo, las mutantes CA de ambos *loci* también causan otro tipo de fenotipos (Li *et al.*, 2001; Molendijk *et al.*, 2001; Fu *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2002). Debido a la cantidad inexplicable de fenotipos que en *Drosophila* se han observado en mutantes DN de GTPasas, se ha propuesto que para este tipo de proteínas la mejor estrategia es usar mutantes que provoquen pérdida de la función. Estudios recientes donde se utilizaron mutantes con pérdida de función de GTPasas pequeñas de *Drosophila*, demostraron que las mutantes DN provocan ciertos fenotipos que no tienen relación con la señalización originalmente estudiada (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2002). Es por esto que no queda claro si los cambio observados en la respuesta a ABA en las mutantes DN ROP2 y ROP6 reflejan su verdadera función en la señalización de ABA. Zheng y colaboradores (2002) reportaron que ROP10 es un regulador negativo específico de las respuestas a ABA en *Arabidopsis*. Una mutante nula, *rop10*, exhibe fenotipos incrementados de la respuesta a ABA en varios procesos: germinación, elongación de las raíces, ensayos de cierre de estomas, y en la inducción de la expresión del FT AtMYB2 (que participa en la respuesta a ABA y deshidratación). Las mutantes nulas *rop10* contienen niveles de ABA comparables con los de las plantas silvestres, y la respuesta a otras hormonas es normal. De manera consistente con estos fenotipos, la expresión transgénica de una forma constitutivamente activa de ROP10 provoca una reducción en la

inhibición de ABA a la germinación, mientras que la expresión ectópica de una forma DN de ROP10 aumenta las respuestas a ABA y suprime a la mutante *abi2* (fosfatasa que regula negativamente la vía de ABA). A su vez, la expresión de *ROP10* se reprime en las puntas de las raíces de plantas tratadas con ABA. ROP10 se encuentra localizada en la membrana plasmática, y esta localización membranal resulta crucial para su funcionamiento (Zheng *et al.*, 2002). En conjunto, todos estos datos sugieren que ROP10 es una GTPasa pequeña de membrana plasmática que participa de manera específica en la regulación negativa de la vía de transducción en respuesta a ABA (Fig. 4). Hasta el momento, no se han reportado otras GTPasas pequeñas con fenotipos claros que indiquen su participación en la vía de ABA.

I.3.5 MENSAJEROS SECUNDARIOS EN LA VÍA DE ABA

El Ca^{2+} funciona como un mensajero intracelular en muchos procesos hormonales de señalización, entre los que se incluyen las respuestas ABA. Con frecuencia se observa un patrón cambiante en la liberación de Ca^{2+} al citoplasma de células guarda en respuesta a ABA, con fases reiteradas de aumento y disminución de Ca^{2+} , a este fenómeno se le llama oscilaciones de Ca^{2+} , y se presume que este evento forma parte de un evento primario de la respuesta a ABA. Cuando se analizan las señalizaciones de ABA, a menudo se separan los pasos que ocurren antes de la elevación de Ca^{2+} de los eventos de transducción posteriores a liberación de Ca^{2+} . Sin embargo, es posible que algún componente de la señalización corriente abajo de Ca^{2+} pudiera afectar la propia liberación de Ca^{2+} , actuando en una especie de circuito regulatorio (ej. afectando la expresión de ciertos genes) lo cual de hecho puede llegar a confundir el análisis de mutantes (Himmelbach *et al.*, 2003).

De la misma manera, varios mensajeros intracelulares derivados de lípidos se encuentran participando en las respuestas a ABA. Durante la señalización en respuesta a ABA, se activan tanto la fosfolipasa C (*PLC*) así como también la fosfolipasa D (*PLD*), lo cual resulta, respectivamente, en un incremento en los niveles de inositol trifosfato (InsP_3) y ácido fosfatídico (PA). Desde hace mucho se sabe que InsP_3 funciona como un segundo mensajero de la vía de ABA, y que regula tanto la señalización, como la regulación del estoma y la expresión de genes (Gilroy *et al.*, 1990). Utilizando transgénicas de tabaco con expresión reducida de *PLC* en las células guarda, Hunt y colaboradores (2003) muestran que se provoca un descontrol en la promoción del cierre del estoma mediado por ABA, y en la inhibición de la apertura del estoma. Estos datos complementan a los de un estudio previo (Sanchez y Chua, 2001), donde utilizando transgénicas sobre-expresoras y antisentidos de *PLC* los

autores concluyen que PLC es necesaria, pero no suficiente, para regular los efectos de ABA en germinación, crecimiento, y expresión génica (Sanchez y Chua, 2001). También otros tipos de fosfoinosítidos parecen estar participando en la vía de ABA. El fosfoinosítido IP₆ parece tener un papel en la inhibición de la apertura del estoma mediada por ABA (Lemtiri-Chlieh *et al.*, 2000). Por otro lado, una mutante en el gen *FIERY1* (inosil polifosfato 1-fosfatasa) que participa en el metabolismo de los fosfoinosítidos, presenta fenotipos de hipersensibilidad a ABA y a estreses abióticos (Xiong *et al.*, 2001c). Además, como se mencionó anteriormente, el fosfolípido SIP (esfingosina-1-fosfato) estimula el cierre del estoma, y para lograrlo requiere de la participación de la proteína G heterotrimérica *GPA1* (Coursol *et al.*, 2003). En conjunto, estos datos apoyan la idea de la participación de los fosfoinosítidos como mensajeros secundarios de la vía de ABA.

Tanto el pH como el estatus redox de las células también son otros factores cruciales para la regulación de la transducción de ABA. Antes del cierre de los estomas en respuesta a ABA exógeno, se sabe que aumenta la concentración tanto de H₂O₂ así como también de óxido nítrico (NO). Aparentemente el ABA “sensibiliza” los canales de influjo de Ca²⁺ mediante un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS; ej. H₂O₂), los cuales pueden funcionar como mensajeros secundarios que juegan un papel importante en la activación de canales (Finkelstein *et al.*, 2002; Himmelbach *et al.*, 2003). Los cambios en las concentraciones de H₂O₂ ó de NO pueden provocar señales redox que se caracterizan por tener una vida media biológica muy corta. Para la generación de H₂O₂ se necesita de la participación de NADPH-oxidasas unidas a membrana (Kwak *et al.*, 2003), mientras que para la generación de NO se necesita de nitrato reductasas y de un complejo glicin-decarboxilasa (Desikan *et al.*, 2002; Chandok *et al.*, 2003). Una doble mutante en las nitrato reductasa apoproteínas 1 y 2 (*nia1*, *nia2*) presenta una deficiente producción de NO en los estomas, así como una desregulación del cerrado de estomas en presencia de ABA (Desikan *et al.*, 2002). Hay dos reportes muy interesantes que ligan directamente al NO con las respuestas al estrés mediadas por ABA y respuesta a patógenos. Ambos son estudios farmacológicos que infieren que para que ocurra la inducción de las respuestas de ABA por parte del NO, se requiere de cADPR y de guanocina cíclica monofosfato (cGMP), lo cual indica que el NO es un activo corriente arriba tanto del incremento de la concentración de Ca²⁺ así como también de *ABI1* y *ABI2* (García-Mata *et al.*, 2002; Neill *et al.*, 2002). Está claro que entre los blancos susceptibles al estado redox de la célula están las fosfatasa *ABI1* y *ABI2*, las cuales se inactivan por H₂O₂ debido a la oxidación de ciertos residuos de cisteína que resultan críticos (Fig. 4) (Meinhard *et al.*, 2002). Por otro lado, la producción de ROS es una respuesta dependiente de ROP que

ocurre ante varios estímulos que provocan el cierre del estoma, como por ejemplo la deshidratación y el ataque por patógenos (Lee *et al.*, 1999), y es probable que esta vía dependiente de ROS sea compartida por varios estreses (Yang, 2002). El trabajo de Kovtun y colaboradores (2000), apoya a la idea anterior, ya que al provocar la activación constitutiva de una cascada de activación mediada por MAP (“mitogen activated protein”) cinasas dependientes de H_2O_2 le confiere un aumento a la tolerancia de varios factores abióticos.

También se ha reportado que los efectos de ABA sobre el cierre del estoma dependen en parte por la alcalinización del citosol. Estudiando parches aislados de membrana se ha observado que existe una estimulación del cierre de estomas mediada por el pH; al menos parcialmente, esta activación parece suceder por un aumento en el número de canales de salida de K^+ . Un aumento en el pH externo provoca tanto la disminución de la actividad de los canales de entrada de K^+ , así como también un aumento en la actividad de GORK, que es un canal de salida de K^+ presente en las células guarda (Finkelstein *et al.*, 2002).

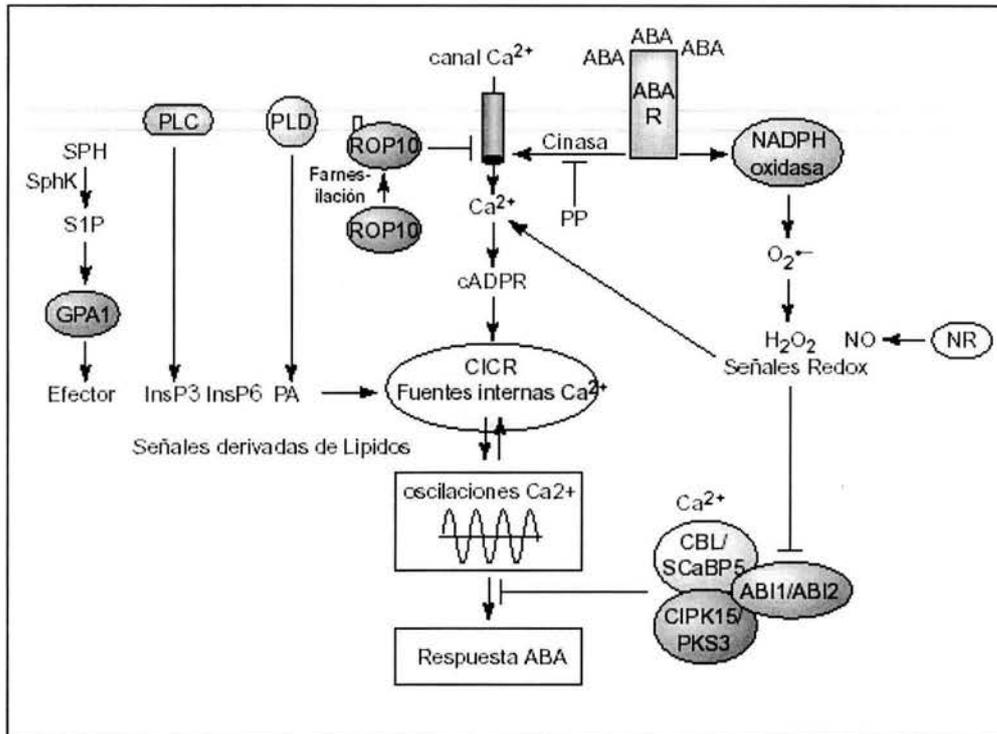


Fig. 4. Un esquema de las señales que controlan las respuestas a ABA en células guarda. El ABA es percibido por un receptor desconocido (ABA R) el cual transmite la señal a una proteína cinasa asociada a membrana, la cual a su vez transmite a canales rectificadores del influjo de Ca^{2+} localizados en el plasmalema. La activación de estos canales es antagonizada por una proteína fosfatasa sensible a ácido akadoico (PP) y por la proteína G pequeña ROP10, la cual es a su vez reclutada a la membrana plasmática mediante farnesilación. La señal de Ca^{2+} activa a una ADPR ciclasa que cataliza la formación de cADPR a partir de NAD. El cADPR provoca una liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR). Esta movilización de Ca^{2+} a partir de fuentes internas esta controlada por otros mensajeros intracelulares, entre los que se incluyen: InsP_3 , el cual es derivado a partir de lípidos mediante la actividad de PLC; myo-inositol hexakisfosfato (InsP_6); y el ácido fosfatídico (PA) el cual se origina de la activación de PLD mediada por ABA. La liberación de Ca^{2+} a partir de fuentes internas, como la vacuola, genera una concentración elevada de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cyt}}$ que posteriormente disminuye por la captura de Ca^{2+} . La repetida transición de concentraciones de Ca^{2+} llamada "Ca²⁺-oscilaciones" lleva a cabo una función central al integrar varias señales que afectan el cerrado del estoma, incluyendo a las señales elicitor y redox. Esta señal redox se origina por la activación mediada por ABA de una NADPH oxidasa y de una nitrato reductasa (NR), provocando así la generación de H_2O_2 y NO (óxido nítrico), respectivamente. Las especies reactivas de oxígeno, como el H_2O_2 , activan el canal rectificador de influjo de Ca^{2+} . Señales que controlan las respuestas del estoma se derivan de esfingosina (SPH) y de fosfolípidos. A su vez, la activación mediada por ABA de una esfingosina cinasa (SphK) convierte el SPH en esfingosina-1-fosfato (S1P), el cual induce el cierre del estoma por una proceso que depende de la subunidad-G α (GPA1) o bien de una proteína G heterotrimérica. La señalización de ABA por debajo de Ca^{2+} es regulada negativamente por las proteína fosfatasa ABI1 y ABI2, las cuales se asocian con la proteína cinasa CIPK15 que a su vez esta asociada a su compañero de interacción CBL (que

Fig.4. Continuación.

además también se une a Ca^{2+}), para formar así un complejo trimérico de proteínas. La activación transitoria de ABI1 y ABI2 mediada por H_2O_2 (y posiblemente también por NO) transmite la señal de ABA hacia componentes mas abajo de la vía, entre los que se incluyen CDPKs y SnRKs los cuales son reguladores positivos de la expresión génica diferencial inducida por ABA así como también del cierre del estoma (modificado de Himmelbach *et al.* 2003).

I.3.6 CASCADAS DE FOSFORILACIÓN EN RESPUESTA A ABA.

Muchas cinasas se encuentran involucradas en la señalización de ABA, ya sea participando en la regulación de la apertura y cierre del estoma, o bien afectando la expresión génica. La expresión de algunas de estas cinasas es inducida en respuesta a ABA, pero otras se expresan constitutivamente aunque la activación de estas proteínas es dependiente de ABA (Finkelstein *et al.*, 2002). En los primeros estudios de la participación de las cinasas en la vía de ABA se aplicaron estrategias farmacológicas utilizando inhibidores. En la mayoría de los casos, los grupos de investigación interesados en el estudio de la fosforilación dentro de la vía han usado los conocimientos acumulados sobre levadura buscando homólogos en las plantas. Principalmente, las cinasas de plantas han sido identificadas en tabaco, alfalfa, maíz y Arabidopsis. Algo importante de mencionar es que la mayoría de las cinasas vegetales no solo se activan por estrés osmótico, sino también por varios estímulos abióticos e incluso por patógenos, lo cual da una idea de la complejidad de este nivel regulatorio en plantas. Por mencionar un ejemplo, en Arabidopsis se reportó que al menos tres MAP cinasas se activan enzimáticamente en respuesta a sal y también por frío, daño mecánico, y otros estímulos medioambientales (Ichimura *et al.*, 2000). Otros estudios han usado alelos dominantes negativos para analizar el papel de ciertas cinasas de manera específica (Sheen *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2000). Por ejemplo, AAPK (“ABA-Activated Protein Kinase”) codifica para una serina/treonina cinasa específica de célula guarda que ha sido involucrada en la regulación de la apertura del estoma (Li *et al.*, 2000). La expresión de una versión recombinante de AAPK, la cual es incapaz de unir ATP, provoca la inhibición del cierre del estoma inducido por ABA al no activar los canales aniónicos; esto no afecta a la inhibición de la apertura del estoma mediada por ABA, lo cual pone de manifiesto el papel de AAPK en la vía que específicamente regula el cierre del estoma, el cual es sólo un segmento de la cadena de señalización en respuesta a ABA (Li *et al.*, 2000). Tanto AAPK de trigo, así como también PKAB1 (“ABA-Induced Protein Kinase1”) de Vicia, son reguladores positivos de la expresión génica y de las respuestas del

estoma mediadas por ABA (Wang *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2002). Ambas proteínas caen dentro de la familia de las SnRKs (“SNF1-Related Protein Kinase”), las cuales se caracterizan por su homología con la proteína cinasa de levadura conocida como SNF1/AMP-regulada (Himmelbach *et al.*, 2003). La cinasa PKABA1 activa por fosforilación al FT tipo b-ZIP conocido como *TaABF*, el cual es gen específico de semilla cuyo producto se une a elementos en *cis* tipo ABRE (“ABA-Responsive Element”). Como un dato importante, *TaABF* presenta una alta homología estructural con *ABI5* de *Arabidopsis* (Johnson *et al.*, 2002). Resulta interesante que AAPK pueda interactuar físicamente con la proteína de unión a RNA conocida como AKIP1, evento que ocurre dentro del núcleo de las células guarda (Li *et al.*, 2002). La fosforilación de AKIP1 por parte de AAPK resulta en la formación de complejos compuestos por AKIP1 y por RNAs mensajeros de dehidrinas. Como se mencionó con anterioridad, el ABA estimula la acumulación de dehidrinas (LEAs, con posibles funciones de protección de macromoléculas), de ahí que estos resultados indiquen un papel para *AKIP1* en la protección de mensajeros para dehidrinas, favoreciendo así su expresión (Li *et al.*, 2002). Es probable que el ortólogo de *AAPK* en *Arabidopsis* sea el gen *OST1* (“Open Stomata1”), el cual también regula las respuestas del estoma mediadas por ABA (Mustilli *et al.*, 2002). La mutante *ost1*, además de presentar abiertos sus estomas, es incapaz de producir ROS en respuesta a ABA en las células guarda, pero mediante la aplicación exógena de H₂O₂ ó Ca²⁺, se rescatan los fenotipos de respuesta a ABA en las células guarda. Además, la mutante *ost1* no presenta fenotipos alterados en al nivel de semilla (viviparismo ó inhibición de la germinación por ABA), lo cual restringe los fenotipos observados únicamente al nivel del estoma (Mustilli *et al.*, 2002).

En plantas, las cinasas dependientes de calcio son candidatas a ser el puente entre las respuestas corriente abajo de la liberación intracelular de calcio en respuesta a estrés osmótico. Utilizando protoplastos de maíz como un sistema de expresión transitorio, Sheen (1996) demostró que la co-expresión de mutantes constitutivamente activas de CDPKs (*ATCDPK1* y *ATCDPK1A*) junto con *GFP* regulado por el promotor *HVA1* de cebada (promotor que responde a estrés) permite la expresión del reportero sin la necesidad de inducción por estrés. Además, versiones dominantes negativas de esas cinasas bloquean la expresión del reportero en respuesta a estrés o ABA. En la actualidad no se conocen a detalle los niveles en que participan estas MAP cinasas y CDPKs de plantas ante el estrés (Zhu, 2002). La señal de entrada podría ser el estrés osmótico (cambios en turgor, por ejemplo) o el mismo daño derivado del estrés osmótico. La salida pudiera ser la acumulación de osmolitos que ayuden a restaurar

la homeostasis, o proteger ante el daño del estrés, o simplemente activar mecanismos de reparación (inducción de genes tipo *LEA*/dehidrinas) (Zhu, 2002).

La señalización de ABA también se encuentra regulada por diversas serín/treonina fosfatasas. Las proteínas con actividad fosfatasa que defosforilan residuos de serina y treonina se clasifican en dos grandes grupos. La familia PPP se constituye por las fosfatasas tipo 1 (PP1), tipo 2A (PP2A) y tipo 2B (PP2B), y se caracterizan principalmente porque sus dominios catalíticos comparten homología en secuencia, además de ser sensibles a inhibidores específicos. En el segundo grupo se encuentran las fosfatasas tipo 2C (PP2C); en la actualidad no se dispone de inhibidores específicos para este grupo de fosfatasas, debido a que el dominio catalítico de estas enzimas no se relaciona a la subunidad catalítica de la familia PPP (Zhu, 2002).

Se han identificado varias fosfatasas tipo PP2C cuya transcripción es regulada positivamente por ABA. La secuencia nucleotídica de los genes *ABI1* y *ABI2* indicó que ambos genes codifican para serina/treonina-fosfatasas tipo PP2C, y que ambos genes son muy similares (Leung et al, 1994., Leung et al., 1997). Otras fosfatasas reguladas por ABA son *AtPP2CA* y *AtP2CHA*, cuya expresión también se encuentra regulada por frío. Utilizando estrategias de reversión de mutantes *abi2*, Merlot et al., (2001) sugieren que *ABI2* regula negativamente la vía de ABA. Por otro lado, plantas transgénicas que expresan *AtPP2CA* en antisentido presentan entre otros fenotipos un aumento en su tolerancia a frío, aumento en su sensibilidad a ABA durante el frío y un aumento en los niveles de expresión en varios genes regulados positivamente por frío o ABA (Tahtiharju y Palva, 2001). Estas evidencias apoyan la idea de que algunas fosfatasas PP2C funcionan como reguladores negativos de la vía de transducción de ABA.

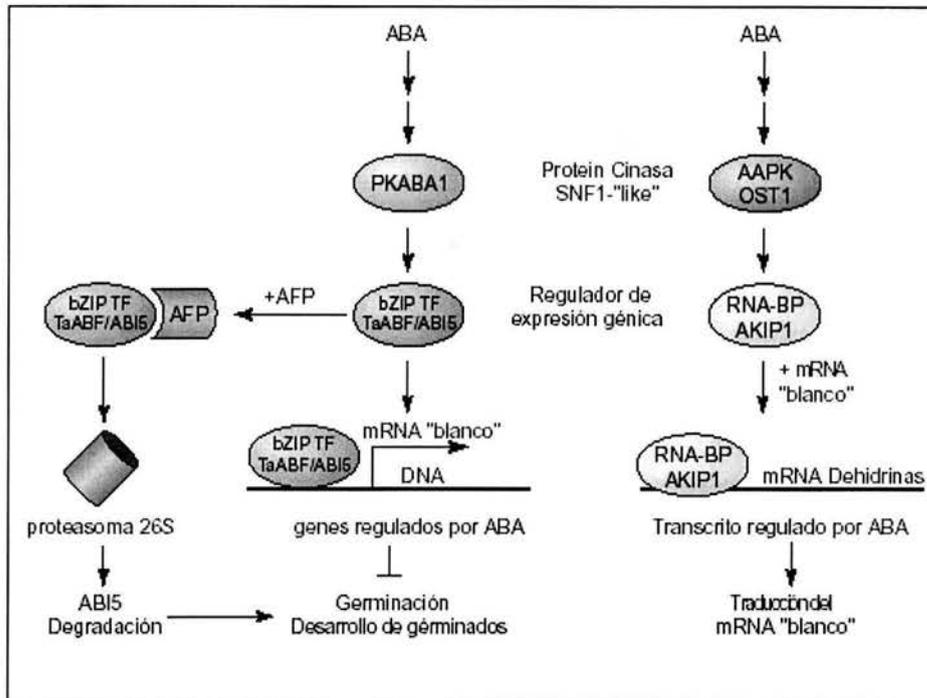


Figura 5. Cascadas de Fosforilación activadas por ABA. El ABA estimula a PKABA1 (proteín-cinasa SNF1-“like” de trigo), la cual a su vez activa mediante fosforilación al factor transcripcional TaABF. Se postula que en *Arabidopsis* podría ocurrir una reacción similar para fosforilar al FT ABI5. La fosforilación estabiliza a ABI5 (homólogo de TaABF), y esto resulta en expresión génica inducida por ABA mediante la unión de ABI5 a elementos de regulación en cis presentes en los promotores regulados por ABA. Se requiere de la expresión de los genes “blanco” de ABI5 para el mantenimiento de la dormancia de la semilla, y también para la inhibición del crecimiento post-embrionario. Para que la semilla pueda superar el arresto embrionario, se requiere que ABI5 sea degradado. Con la interacción dada entre ABI5 y la proteína AFP se inicia el proceso de degradación de ABI5 por la vía del proteosoma 26 S dependiente de ubiquitina. A diferencia de *PKABA1*, cuyo producto regula la transcripción de genes inducidos por ABA, tanto la proteín cinasa AAPK (SNF1-“like”) de Vicia así como también la OST1 de *Arabidopsis* regulan un evento post-transcripcional que ocurre durante la expresión específica de ABA de algunos genes. De manera semejante a *PKABA1*, la activación mediada por ABA de AAPK provoca la fosforilación de una proteína heteronuclear de unión a RNA (RNA-BP) conocida como AKIP1. En su estado fosforilado, AKIP1 se une a RNAs mensajeros, entre los cuales se incluyen mRNAs que codifican para dehidrasas (LEA clase II)) que son requeridas para la adaptación de las células a bajos potenciales de agua. Es probable que AKIP1 pudiera incrementar la exportación al núcleo de los transcritos de las dehidrasas que se acumulen en complejos subnucleares. Estos pasos regulatorios ocurren en el núcleo (modificado de Himmelbach *et al.*, 2003).

I.4 FACTORES TRANSCRIPCIONALES INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA A ESTRÉS MEDIOAMBIENTAL.

Los genomas vegetales poseen un elevado número de FTs. Como un ejemplo, *Arabidopsis* dedica cerca del 5.9% de su genoma en codificar mas de 1500 FTs. En los últimos años se han generado importantes avances en la caracterización de algunos genes cuyos productos regulan la transcripción en respuesta a ácido abscísico y/o sequía, aunque el conocimiento acumulado está muy lejos de ser suficiente para entender el mecanismo(s) por medio del cual estos estímulos llevan a cabo su función reguladora a nivel transcripcional. Basándose en el tipo de dominio de unión a DNA que presentan, a la fecha se han identificado al menos 6 clases de factores de transcripción que están involucrados en la respuesta a ABA, sequía, o estrés osmótico. Algunas de estas clases de FTs han sido encontradas únicamente en plantas. A continuación se presenta una revisión de los distintos tipos de FTs que se encuentran involucrados en la regulación de genes que responden a ABA y/o estrés.

I.4.1 FTs tipo cierre de Leucina básico (b-ZIP). Los FTs tipo cierre de Leucina básico (b-ZIP) contienen un dominio de unión a DNA rico en residuos básicos que se encuentra adyacente a un dominio de dimerización tipo cierre de leucina. Varios TFs tipo b-ZIP se unen al elemento en *cis* conocido como ABRE (Elemento de Respuesta a ABA, c/tACGTggc) el cual se encuentra en muchos promotores que responden a deshidratación y/o a ABA. Entre estos se encuentra EmBP1 de trigo, el cual transactiva al promotor del gen *Em* que codifica una LEA clase 1 (Gultinan *et al.*, 1990). También se han identificado b-ZIPs cuyos productos se unen a ABRE en tabaco (*TAF1*) y en arroz (*OSBZ8*, *OsZIP-1a*, *TRAB1*) (Oeda *et al.*, 1991; Nakagawa *et al.*, 1996; Nantel y Quatrano, 1996; Hobo *et al.*, 1999). Se ha demostrado que *TRAB1* interacciona *in vivo* con el TF *OsVP1* para juntos poder transactivar el promotor de *OsEm* (Hobo *et al.*, 1999).

De igual manera, en *Arabidopsis* se identificó una familia de b-ZIPs que se unen a elementos ABRE (ABF2, ABF3 y ABF4) y que además participan en la señalización de estrés osmótico (Choi *et al.*, 2000). De manera independiente, Uno y colaboradores (2000) también aislaron dos clonas de cDNA que codifican para b-ZIPs con capacidad de unirse a ABRE (*AREB1* y *AREB2*) y cuya transcripción es regulada positivamente por sequía, NaCl y ABA. Tanto *AREB1* y *AREB2* activan la transcripción de un gen reportero manejado por ABRE y requieren de ABA para activarse. Por último, utilizando la estrategia de clonación posicional en la mutante *abi5*, Finkelstein y Lynch (2000) reportan que *ABI5* codifica para un FT tipo b-ZIP regulado por ABA; Lopez-Molina y colaboradores (2002) demuestran

que ABI5 actúa debajo de ABI3 en la vía de ABA, y además presenta evidencia de que ABI5 regula a los genes *AtEm1* y *AtEm6*. Lo anteriormente expuesto coincide con los resultados obtenidos por Bensmihen y colaboradores (2004), donde confirman la regulación de ABI5 sobre *AtEm1* al cruzar dos tipos de plantas transgénicas, una que sobreexpresa *ABI5* y otra que porta el promotor *AtEm1* fusionado al gen reportero GUS.

I.4.2 FTs tipo B3. Este tipo de FTs se caracterizan por la presencia de un dominio de 120 aminoácidos conservados presente en la región carboxilo conocido como dominio B3 (Liu *et al.*, 1999). *VP1* de maíz es un co-activador de varios genes específicos de semilla que son regulados por ABA (McCarty *et al.*, 1991; Vasil *et al.*, 1995), y esta co-activación depende fuertemente de ABA (Carson *et al.*, 1997; Vasil *et al.*, 1995). El TF VP1 contiene cuatro dominios conservados que se denominan A1, B1, B2, y B3 (Giraudat *et al.*, 1992). La proteína VP1 completa no puede unirse a DNA (en estudios *in vitro*), sin embargo el dominio B3, por sí solo, tiene la capacidad de unirse de manera específica al elemento *cis* conocido como Sph (Suzuki *et al.*, 1997). Por otro lado, el gen *VP1* codifica para una proteína que junto con ABA es capaz de transactivar a los genes *c1* y *Em* durante la maduración de la semilla de maíz (McCarty *et al.*, 1991), aunque no se ha demostrado una interacción directa entre VP1 y el promotor *Em*. Para el caso del promotor *c1*, se ha demostrado que un dominio (conocido como B3) de la proteína VP1 es esencial para la transactivación de este promotor, además de que este mismo dominio se une de manera específica a un elemento *cis* conocido como Sph que resulta esencial para la respuesta a ABA (Kao *et al.*, 1996., Suzuki *et al.*, 1997).

En *Arabidopsis*, el gen *ABI3*, al igual que su homólogo *VP1* de maíz, codifica para un FT que presenta una organización estructural singular para este tipo de proteínas (Giraudat *et al.*, 1992). En base a conservación de la secuencia de aminoácidos y en la similitud de los fenotipos de las mutantes, se considera que la proteína *ABI3* de *Arabidopsis* es un ortólogo de *VP1* (Suzuki *et al.*, 2001). *ABI3*, el cual fue identificado inicialmente como una mutante insensible a ABA (mutante *abi3*; Giraudat *et al.*, 1992), comparte funciones complementarias con *VP1* de maíz, ya que la expresión ectópica de *VP1* en el fondo genético de *abi3* puede restaurar la sensibilidad a ABA y el fenotipo de floración temprana que exhiben las mutantes *abi3* (Suzuki *et al.*, 2001). Estas mismas plantas transgénicas *35S::VP1* en la mutante *abi3* fueron estudiadas por Suzuki y colaboradores (2003) utilizando microarreglos y comparando los datos al utilizar RNA de plantas *abi3*. En las plantas sobre-expresoras de *VP1* tratadas con ABA se observaron alteraciones en la expresión de cerca del 73% de los 7402 genes nucleares

representados en el microarreglo. Muchos genes específicos de semilla presentan expresión constitutiva en tejidos vegetativos de las plantas transgénicas, lo cual respalda la coparticipación de VP1 y ABI3. En las transgénicas, *ABI5* (regulador positivo de ABA) se encuentra activado, mientras que los reguladores negativos *ABI1* y *ABI2* (ambas PP2Cs) se encuentran inhibidos, revelándose así dos ramificaciones de la vía. Dependiendo de los elementos *cis* presentes en sus promotores, los genes co-activados por ambos, VP1 y ABA, caen en dos grupos: los que tienen ABREs y lo que poseen Sphs, mientras que los genes que solo son inducidos por ABA no tienen elementos Sphs. En otro trabajo, la expresión ectópica de *ABI3* reveló la importancia de este TF al mediar puntos importantes de las respuestas de *Arabidopsis* ante ABA y frío. Estas plantas transgénicas presentan niveles de transcrito más altos de los genes *RAB18* y *LTI78*, además de tener una mayor tolerancia a estrés por frío (Tamminen *et al.*, 2001) y una mayor sensibilidad a ABA.

Como se mencionó anteriormente, Hobo y colaboradores (1999) demostraron que la proteína OsVP1 (considerado un ortólogo de VP1) de arroz interacciona de manera específica con un TRAB1 (b-ZIP) y juntos transactivan el promotor de la LEA *OsEm*.

1.4.3 Homeodominio-cierre de leucina (HD-ZIP). Los genes tipo Homeodominio-cierre de leucina (HD-ZIP) codifican proteínas que hasta la fecha únicamente se han identificado en plantas. En general, este tipo de proteínas participan regulando procesos del desarrollo y respuestas frente al medioambiente. La actividad de las proteínas HD-ZIP se caracteriza por la presencia de un dominio de unión a DNA tipo homeobox adyacente a un motivo tipo cierre de leucina. El dominio HD tiene una alta especificidad de unión a DNA, mientras que el cierre de leucina tiene la capacidad de mediar interacciones con otras proteínas. Se calcula que en *Arabidopsis* existen más de 40 miembros de esta familia (Johannesson *et al.*, 2003).

En el tejido vegetativo de *Arabidopsis* sometido tanto a estrés hídrico ó ABA, se observa la inducción de la expresión de una proteína tipo HD-ZIP, *ATHB-7* (Söderman *et al.*, 1996). A nivel transcripcional, *ATHB7* se encuentra en niveles basales en todos los órganos de la planta, pero su transcrito aumenta rápidamente en respuesta a ABA o deshidratación. En mutantes *aba* y *abil*, la expresión de este gen disminuye drásticamente. Hoy en día, no se conocen aún los genes blancos de *ATHB-7*.

Otro miembro de esta familia regulado por deshidratación y ABA es *ATHB12*. Al comparar la cinética de expresión de *ATHB12* contra la de *ATHB7*, Lee y Chun (1998) encontraron algunas

diferencias, lo cual sugiere que estos dos genes podrían estar siendo regulados de diferente manera en respuesta a ABA. A la fecha, no han sido reportados fenotipos de mutantes o líneas sobre-expresoras de *ATHB12*, lo cual limita el conocimiento de la importancia de este gen dentro de la vía.

Recientemente se identificó a *ATHB5* como otro miembro de esta familia HD-ZIP que se encuentra participando en la respuesta a ABA en plántulas en desarrollo de *Arabidopsis* (Johannesson *et al.*, 2003). La expresión de *ATHB5* es dependiente del estado de desarrollo, ya que aunque no se expresa en semillas secas, su expresión se induce desde las 12 hrs de inmersión en agua, y se mantiene en su punto mas alto en plántulas de 1 día de germinación y va decreciendo paulatinamente al paso de los días hasta que al día 16 de germinación el nivel de transcrito de *ATHB5* es apenas 0.02% al compararse con el día 1. En estados de desarrollo temprano (día 1), la expresión del gen reportero GUS regulado por el promotor *ATHB5* se restringe al hipocotilo, mientras que en estados de desarrollo posteriores (día 8) también se observa expresión de GUS en cotiledones y hojas en desarrollo. En experimentos tipo Northern, la expresión de *ATHB5* se ve disminuida cuando plantas de dos días son expuestas a ABA. En experimentos con GUS, el tratamiento con GUS provoca una redistribución de la expresión, ya que disminuye considerablemente la expresión en la parte apical del hipocotilo, mientras que prácticamente no se observa variación en la zona de transición. Una mutante *athb5* no presenta fenotipos, mientras que la sobre-expresión de *ATHB5* provoca una mayor sensibilidad a ABA medida como porcentaje de germinación en distintas concentraciones de ABA. En comparación con plantas silvestres, las líneas sobre-expresoras de *ATHB5* tratadas con ABA presentan un incremento de tres veces en la expresión del gen *RAB18* (Johannesson *et al.*, 2003).

En *C. plantagineum* también se identificaron dos genes tipo homeobox-cierre de leucina (*CPHB-1* y *CPHB-2*), cuya expresión es inducida por sequía, aunque sólo *CPHB-2* responde a ABA. Estudios *in vitro* revelaron que *CPHB-1* se une a la secuencia pseudopalindrómica CAAT(C/G) ATTG. Aunque no se conoce el promotor (es) sobre el cual estas proteínas ejercen su función, la expresión diferencial de estos genes sugiere que participan en diferentes ramificaciones de la vía de transducción durante la respuesta a sequía (Frank *et al.*, 1998).

I.4.4 FTs tipo ERF/AP2. En *Arabidopsis*, esta numerosa familia de FTs esta compuesta por 144 miembros (Riechman *et al.*, 1998; Sakuma *et al.*, 2002). Estas proteínas presentan un dominio de unión a DNA que había sido reportado anteriormente para la proteína APETALA2 de *Arabidopsis*, involucrada en el desarrollo floral, y es por esto que este tipo de dominio fue llamado originalmente

AP2. A partir del trabajo de Riechman y colaboradores (1998) el nombre cambio por dominio ERF/AP2 en honor a los miembros mejor conocidos de este tipo de factores, que son APETALA2 y ERF1 (involucrado en la respuesta a etileno). Este dominio contiene un motivo de 68 aminoácidos repetido 1 o 2 veces (dominio ERF/AP2) (Jofuku *et al.*, 1994). Dentro de cada dominio AP2 existen 2 bloques de secuencias conservadas. El primero bloque (elemento YGR) consiste de 19-22 aminoácidos, es altamente básico y contiene los aminoácidos conservados YGR. El segundo bloque conservado se conoce como elemento YADR, es de 42-43 aminoácidos y contiene una región central de 18 aa altamente conservados; se ha predicho que esta región central del elemento YADR forma una α -hélice anfipática en los dominios AP2 (Okamura *et al.*, 1997).

Las proteínas de Arabidopsis CBF1, CBF2 y CBF3 (“C-repeat binding factor”; Stockinger *et al.*, 1997; Gilmour *et al.*, 1998) y sus correspondientes homólogos (DREB1B, DREB1C y DREB1A; “dehydration-responsive element binding factor”; Liu *et al.*, 1998) de la familia AP2/EREF, se unen al elemento *cis* de respuesta a frío y sequía conocido como DRE (“dehydration responsive element”) el cual también se conoce como C-repeat (CRT) (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994; Baker *et al.*, 1994). Este elemento DRE/CRT contiene la secuencia central CCGAC, el cual por si solo es capaz de manejar la respuesta a frío en varios genes y se encuentra presente en los promotores de muchos genes regulados por frío (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994; Baker *et al.*, 1994; Tomashow, 1999). A pesar de ser inducidos por frío (y algunos por sequía), ninguno de los *CBF/DREB* contienen la secuencia CCGAC en sus promotores. La inducción por frío de los *CBF/DREB* es transitoria y muy rápida, y esta inducción antecede a la expresión de los genes regulados por frío que si portan el elemento DRE/CTR (Gilmour *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 1998; Medina *et al.*, 1999). Por otro lado, la expresión ectópica de *CBF1/DREB1B* y de *CBF3/DREB1A* provoca la inducción transcripcional de genes de respuesta a frío, aún en condiciones de temperatura cálida, además de presentar un incremento de su tolerancia a temperaturas congelantes (Liu *et al.*, 1998; Jaglo-Ottose *et al.*, 1998; Kasuga *et al.*, 1999; Gilmour *et al.*, 2000). Hasta la fecha no se ha reportado la sobre-expresión de la proteína *CBF2/DREB1C*, sin embargo, muy recientemente, se reportó el aislamiento y caracterización de una mutante en este gen de Arabidopsis (Novillo *et al.*, 2004). La mutante en *CBF2/DREB1C* presenta un incremento en su tolerancia a estrés por frío, sequía y salinidad, lo cual sugiere que su papel es el de regular negativamente a la vía. Además de estos fenotipos, la mutante muestra un incremento en los niveles de transcripción tanto de *CBF1/DREB1C* como de *CBF3/DREB1A*, así como también incrementa la

expresión de varios genes de respuesta a frío que normalmente son regulados por estos dos FTs (Novillo *et al.*, 2004).

Otro importante miembro de este tipo de FTs es la proteína codificada por *ABI4*. Utilizando estrategias de clonación posicional, Finkelstein y colaboradores (1998) lograron la clonación del gen *ABI4* y encontraron que codifica para un FT del tipo ERF/AP2. Debido a que los fenotipos de la mutante *abi4* se observaban únicamente a nivel de semilla, fue novedoso confirmar que su expresión no estaba limitada a semilla, ya que aunque en menor medida, también se observa expresión de este gen en tejidos vegetativos sometidos a estrés o ABA (Finkelstein *et al.*, 1998; Söderman *et al.*, 2000). La expresión ectópica de *ABI4* en el fondo genético de la mutante *abi4*, provoca un fenotipo de sensibilidad a ABA semejante a la silvestre (Söderman *et al.*, 2000). Además de estar involucrado en la señalización de ABA y estrés, *ABI4* también se encuentra participando de manera importante en la respuesta a azúcares, específicamente glucosa (Glc), ya que la mutante *abi4* muestra un claro fenotipo de insensibilidad a altas concentraciones de Glc (Arenas-Huertero *et al.*, 2000). Un análisis detallado de la expresión de *ABI4* en fondos silvestres y mutantes, indicó que además de expresarse en respuesta a estrés y ABA, el transcrito de *ABI4* también se acumula mediante una respuesta específica a Glc (Arroyo *et al.*, 2003). Por otro lado, la expresión ectópica del homólogo de *ABI4* de maíz (*ZmABI4*) en el fondo de la mutante *abi4* de Arabidopsis, es suficiente para rescatar los fenotipos de insensibilidad a ABA y de insensibilidad a Glc (Niu *et al.*, 2002).

I.4.5 FTs tipo bHLH (antes MYC). Las proteínas de este tipo poseen un dominio básico de unión a DNA tipo “helix-loop-helix” (bHLH). El dominio bHLH el cual esta compuesto de dos subdominios: la región básica y la región HLH. El subdominio HLH es la región responsable para la dimerización de la proteína. En dos reportes recientes se han analizado a esta familia de FTs utilizando herramientas informáticas para hacer una clasificación detallada de ellas (Heim *et al.*, 2003; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Sin embargo, existen algunas discrepancias y contradicciones al comparar los resultados obtenidos por ambos grupos. Algunos meses después, ambos equipos de investigación y algunas autoridades en el campo, se unieron para finalmente establecer una nueva clasificación y nomenclatura para este tipo de FTs (Bailey *et al.*, 2003). Este tipo de proteínas conforma una de las familias mas abundantes de FTs en Arabidopsis, ya que se ha calculado que esta compuesta por al menos 162 miembros (Bailey *et al.*, 2003). En *A. thaliana* se reportó la presencia de un gen tipo bHLH/MYC (*rd22BP1*) cuya expresión es inducida por sequía, salinidad y ABA. La proteína *rd22BP1*

se une *in vitro* a un elemento en *cis* tipo MYC presente en el promotor del gen *rd22* y además, puede transactivar este promotor en experimentos realizados en protoplastos aislados a partir de hojas de *A. thaliana* (Abe *et al.*, 1997). Se ha propuesto una interacción entre *rd22BP1* y una proteína tipo MYB llamada *AtMYB2* (Abe *et al.*, 1997; Abe *et al.*, 2003).

Recientemente, en *Arabidopsis* fue reportado otro miembro de este tipo de FTs involucrado en la respuesta a estrés por frío. Utilizando clonación posicional, Chinnusamy y colaboradores (2003) identificaron el gen *ICE1*, cuyo producto es un regulador transcripcional (bHLH) de los FTs de respuesta a frío conocidos como CBFs (tipo ERF/AP2). El aislamiento de la mutante se realizó buscando plantas que no pudieran inducir la transcripción del promotor *CBF3* fusionado a luciferasa. La mutante *ice1* presenta varios fenotipos: bloquea la expresión de *CBF3*, la expresión de muchos genes debajo de los CBFs también se ve disminuida, y presenta una reducción en su tolerancia a frío y a temperaturas de congelación. Por otro lado, en ensayos de retardamiento en gel, la proteína *ICE1* tiene la capacidad de unirse de forma específica a secuencias tipo MYC (consenso CATTG) presentes en el promotor *CBF3*. La expresión de *ICE1* es constitutiva en raíz, tallo, hoja y flor, aunque el nivel de transcrito de *ICE1* aumenta ligeramente en respuesta a ABA, frío y NaCl pero no ante deshidratación. Para finalizar, la expresión ectópica de *ICE1* en plantas silvestres provoca un aumento en la expresión del regulón *CBF*, y aumenta significativamente la tolerancia a temperaturas de congelación (Chinnusamy *et al.*, 2003).

1.4.6 FTs tipo MYB. La súper familia de genes MYB (“avian myeloblastosis virus”) esta compuesta por genes relacionados con orígenes tan diversos como lo son animales, hongos, y plantas (Jiang *et al.*, 2004). Debido a que fué el primer MYB identificado, el arquetipo de este tipo de genes es el oncogene *v-myb* del virus de la mieloblastosis avícola (Klempnauer *et al.*, 1982). Posterior a este descubrimiento, se han ido identificando toda una multitud de genes MYB en los tres reinos antes mencionados, sin embargo no existe este tipo de genes en procariontes. Los genes MYB codifican proteínas que poseen dominios de unión a DNA en el extremo amino terminal, que pueden estar compuestos de uno, dos o tres motivos semiconservados arreglados es tandem, y cada motivo esta compuesto de 50-52 aminoácidos (Martin y Paz-Ares., 1997; Strake *et al.*, 2001). Cada uno de los motivos tiene la capacidad de formar 3 α -hélices; se ha propuesto que la tercera α -hélice juega un papel importante en el reconocimiento y unión a una secuencia específica de DNA (Rabinowicz *et al.*, 1999). Además de ser semi-conservados en secuencia, cada dominio MYB se caracteriza por poseer tres residuos de triptofano espaciados de manera regular cada 19 aminoácidos, aproximadamente. Estos

residuos de triptofano forman un “cluster” de triptofanos dentro de la estructura tridimensional que ha sido determinada en varias proteínas MYB (Stracke *et al.*, 2001). Dependiendo de su posición, a los motivos en tandem antes mencionados se les denominan R1, R2 y R3. Curiosamente, en *Arabidopsis* se reportó la presencia de un gen MYB que posee cuatro repeticiones (Strake *et al.*, 2001). Por otro lado, el dominio de transactivación de los genes MYB no se conserva, pero siempre presenta un carácter ácido y puede estar sujeto a modificaciones postraduccionales como fosforilación (Thompson y Ramsay, 1995). Dependiendo del número de repeticiones adyacentes del dominio MYB (uno, dos o tres), a las proteínas tipo MYB se les puede clasificar en tres subfamilias: las que tienen solo un dominio MYB se conocen como factores MYB1R, las de dos dominios son los factores tipo R2R3, y finalmente las que poseen tres repeticiones del dominio MYB se conocen como factores MYB3R (Jin y Martin, 1999; Rosinski y Atchley, 1998; Strake *et al.*, 2001).

Los genes MYB de plantas son muy diversos, tanto estructural como funcionalmente (Jiang *et al.*, 2004). La función de la mayoría de los MYB vegetales aún no se conoce, aunque existen ejemplos de genes MYB bien caracterizados que indican al menos tres roles perfectamente definidos para los genes MYB de plantas: controlan el metabolismo secundario, particularmente la biosíntesis de flavonoides (Grotewold *et al.*, 1994); regulan la morfogénesis celular (Oppenheimer *et al.*, 1991); y también regulan vías de transducción de señales, como es el caso de la respuesta a estrés abiótico (Urao *et al.*, 1993). Además, es probable que algunas proteínas MYB de plantas pudieran tener papeles estructurales, como es el caso de RTBP1, una proteína MYB que se ha sido implicada en la función del telómero (Yu *et al.*, 2000).

El genoma de *Arabidopsis* contiene 125 genes tipo MYB R2R3 (Reichmann y Ratcliffe, 2000; Strake *et al.*, 2001), mientras que en maíz y otras monocotiledóneas se calcula que podrían existir más de 200 (Dias *et al.*, 2003). Estos datos contrastan con el pequeño número de genes MYB presentes en animales y en hongos, donde existen alrededor de una docena de estos genes (Lipsick, 1996).

Muy poco se conoce sobre el papel de los genes MYB tipo R2R3 en la regulación de las respuestas a estrés osmótico. En un esfuerzo por conocer la regulación de los genes MYB de *Arabidopsis*, Kranz y colaboradores (1998) utilizaron “Northern reversos” sobre un macroarreglo de genes MYBs que contenía 91 cDNAs que representan casi el 73% de los 125 miembros de la familia R2R3 de *Arabidopsis* (Reichmann y Ratcliffe, 2000; Strake *et al.*, 2001). Entre las más de 20 condiciones de crecimiento analizadas, Kranz y colaboradores (1998) utilizaron plantas tratadas con ABA, ó bien plantas sometidas a deshidratación. Muy pocos genes MYB fueron inducidos con estos tratamientos. Sin

embargo, los que mejor responden a ABA fueron: *AtMYB1*, *AtMYB2*, *AtMYB3*, *AtMYB7*, *AtMYB13*, *AtMYB38*, *AtMYB44*, *AtMYB73*, y *AtMYB74*. Por otro lado, en respuesta a sequía se induce la transcripción de los genes *AtMYB1*, *AtMYB2*, *AtMYB3*, *AtMYB4*, *AtMYB6*, *AtMYB7*, *AtMYB13*, *AtMYB29*, *AtMYB32*, *AtMYB34*, *AtMYB44*, *AtMYB59*, *AtMYB74*, *AtMYB75*, *AtMYB77*, *AtMYB90*, *AtMYB91*, *AtMYB94*, y *AtMYB102* (Kranz *et al.*, 1998). A raíz de estos datos, es evidente que existe un buen número de genes MYB regulados por estrés hídrico y ABA, lo cual indica que este tipo de FTs pudiera estar participando de manera importante en la regulación del estrés abiótico.

En *A. thaliana*, el gen *AtMYB2* es el FT tipo MYB R2R3 mejor conocido de los que participan regulando estrés abiótico, el cual responde a ABA y a estrés osmótico. La proteína *AtMYB2* se une a elementos en *cis* tipo MYB (MYBS) (Urao *et al.*, 1993). Mediante ensayos de co-transfección en protoplastos de hoja de *Arabidopsis*, se encontró que *AtMYB2* es capaz de transactivar un promotor quimérico que porta cinco repeticiones de MYBs en tandem (Urao *et al.*, 1996). Los datos indican una interacción funcional entre las proteínas *AtMYB2* y *rd22BP1* (tipo MYC) durante la transactivación del promotor del gen *rd22* (promotor de respuesta a ABA y a sequía) de *Arabidopsis* (Abe *et al.*, 1997), tal y como ocurre en la transactivación del promotor del gen *bz1* (involucrado en la biosíntesis de antocianinas), donde interaccionan las proteínas B1 (MYC) y C1 (MYB) (Goff *et al.*, 1992). Recientemente, se reportó que la sobre-expresión combinada de *ATMYB2* y *rd22BP1* (renombrado como *AtMYC2*) en *Arabidopsis*, provoca un aumento en la sensibilidad a ABA, así como también un aumento en la expresión de varios genes regulados por ABA (Abe *et al.*, 2003). Estos datos indican que tanto *AtMYB2* como *AtMYC2* participan como activadores transcripcionales durante la vía de señalización en respuesta a ABA. Además de inducirse por ABA, estrés osmótico y sequía, el transcrito de *AtMYB2* también se acumula en respuesta a frío e hipoxia, aunque la respuesta mas fuerte es ante deshidratación (Hoeren *et al.*, 1998). Además, *AtMYB2* se une a dos sitios *cis* tipo MYB presentes en el promotor del gen *ADH1* (alcohol deshidrogenasa), un gen cuyo transcrito también se acumula en respuesta a estrés por bajo oxígeno, sequía y ABA. Utilizando la sobre-expresión de *AtMYB2* y el promotor de *ADH1* de *Arabidopsis* fusionado a GUS en ensayos de transactivación, se observó que *AtMYB2* es capaz de transactivar el promotor de *ADH1*, tanto en protoplastos de *Arabidopsis* y tabaco, así como también en experimentos de bombardeo de partículas sobre hojas de chícharo (Hoeren *et al.*, 1988), lo cual indica que *AtMYB2* juega un papel en la regulación de *ADH1* ante el estrés abiótico.

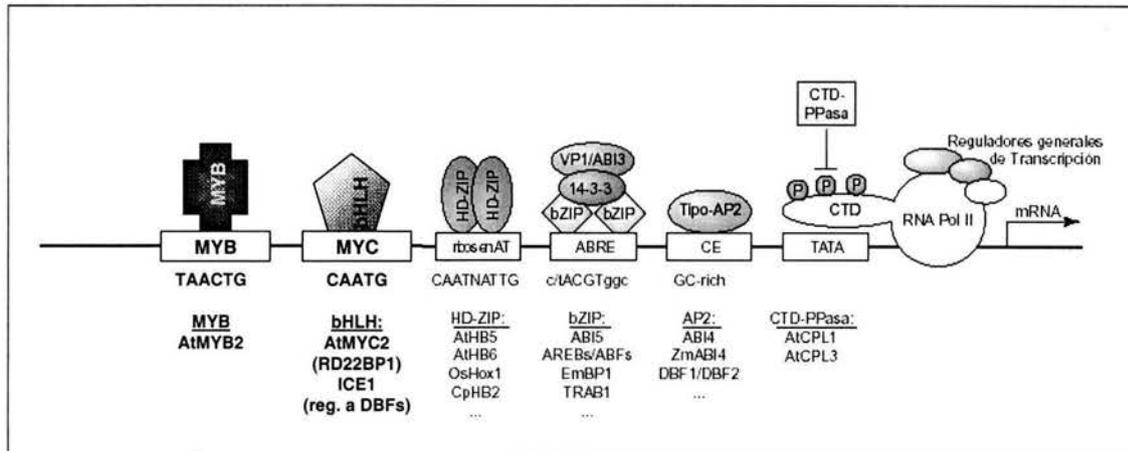


Figura 6. Principales Factores Transcripcionales y elementos *cis* que participan en la expresión de genes regulados por ABA y/o estrés abiótico. El complejo transcripcional está compuesto por la asociación de la RNA polimerasa II (RNA Pol II) con reguladores transcripcionales generales, entre los que se encuentra la proteína de unión a la caja TATA. Esta maquinaria de transcripción se encuentra controlada mediante la unión de los FTs regulatorios a elementos *cis* específicos presentes en los promotores regulados por ABA. El elemento *cis* conocido como ABRE es contactado por dímeros de TFs tipo b-ZIP, tales como ABI5 de Arabidopsis, el cual se asocia con los reguladores transcripcionales ABI3 (VP1 de maíz) y la proteína 14-3-3. Por otro lado, el elemento acoplador CE1 es el blanco de TFs tipo ERF/AP2, tales como ABI4, el cual ayuda a la transcripción inducida por ABA. Las proteínas ATHB5 y ATHB6 (tipo HD-ZIP), se unen a secuencias pseudopalindrómicas ricas en AT. La RNA Pol II es regulada por la fosforilación de su dominio carboxilo terminal (CTD). Es probable que la desfosforilación de CTD por una proteína fosfatasa CTD-específica (AtCPL3) regule negativamente la expresión de los genes inducidos por ABA (modificado de Himmelbach *et al.*, 2003).

II. ANTECEDENTES DEL PROYECTO

En el laboratorio del Dr. Gabriel Iturriaga se reportó el aislamiento y secuenciación de dos clonas genómicas completas (*CpMYB10* y *CpMYB5*), y una clona de cDNA (*CpMYB7*) de *C. plantagineum* que codifican para factores de transcripción tipo MYB (Iturriaga *et al.*, 1996). Los tres genes poseen dos repeticiones del dominio de unión a DNA tipo MYB, por lo cual se les considera dentro de la subfamilia R2R3. Usando una sonda común para estos tres genes, en experimentos tipo “Northern” se encontró que la expresión de alguno (s) de estos genes es inducida por ABA en células de callos de *C. plantagineum* y en raíces sometidas a sequía, pero no se detectó su expresión en hojas ni en semillas de esta planta. En *Arabidopsis*, el gen más cercano a estos tres MYBs de *Craterostigma* es el gen *AtMYB2*, el cual es un FT tipo MYB cuya expresión es inducida por sequía, ABA, y estrés salino. Los dominios de unión a DNA de *CpMYB10* y *AtMYB2* presentan un 92% de similitud, pero la región carboxilo (230 aa) de *CpMYB10* es completamente diferente a la región correspondiente de *AtMYB2*, a excepción de una pequeña región de 31 aa en donde ambas proteínas muestran una similitud de 87% (Fig. 7). Los resultados reportados por Iturriaga y colaboradores (1996) sugieren que los genes MYB *CpMYB10*, *CpMYB7* y *CpMYB5* podrían participar en la transducción de la señal del estrés hídrico en *C. plantagineum*. Sin embargo, las secuencias codificantes de los tres genes MYB presentan altos niveles de identidad entre ellos (96-98%), lo cual aunado a sus bajos niveles de expresión hace muy difícil el análisis específico de cada uno de ellos en experimentos tipo “Northern” (Fig. 8).

Por otro lado, es probable que *Craterostigma* y *Arabidopsis* pudieran tener diferencias en la regulación de la expresión de genes en respuesta a estrés hídrico. A raíz de los proyectos genómicos que existen para distintas plantas, sobre todo en los últimos años se han ido identificando genes ortólogos para algunos de los FTs que participan en la respuesta de *Arabidopsis* ante el estrés. Sin embargo, hay que recordar que *Craterostigma* (planta de resurrección) es una planta que parece estar genéticamente mejor preparada para contender con el estrés hídrico. *Arabidopsis*, por el contrario, es una planta muy sensible a pequeños cambios en el ambiente. Por lo tanto, es probable que las diferencias que existen entre *Craterostigma* y *Arabidopsis* en sus tolerancias al estrés medioambiental, pudieran deberse a distintas maneras de regular genéticamente sus respuestas, más que a la presencia o ausencia de genes importantes para la respuesta ante el estrés en sus genomas. Los FTs tipo MYB de *Craterostigma* podrían estar regulando de una manera importante las respuestas de esta planta ante el estrés por sequía. El hecho de que las regiones carboxilo terminal de *CpMYB10*, *CpMYB7* y *CpMYB5* sean diferentes a la

región correspondiente de AtMYB2, sugiere que estas proteínas podrían interactuar con distintos FTs, lo cual implicaría que participan en distintas ramificaciones de la vía de transducción en respuesta al estrés por deshidratación. Adicionalmente, para poder entender estas ramificaciones de la vía, sería interesante llevar a cabo un análisis más detallado de los patrones de expresión de *CpMYB10*, *CpMYB7* y *CpMYB5* ante el estrés abiótico.

Atmyb2	MEDYE--RIN-----SNSP	THEEDSDVRK	GPWTEEDAI	LWVFVSIHGQ	42	
Cpm5	MNQQQ-VKVS	KNNKQVNNCE	DDDDSSDLRR	GPWTVDEDFI	49	
Cpm10	MNQQQ-VKVS	KNNKQVNNCE	DDDDSSDLRR	GPWTVDEDFI	49	
Cpm7	MNQQQVVKVS	KN-KQINS-E	DDDDSSDLRR	GPWTVDEDFI	48	

Atmyb2	ARWNIARSS	GLKRTGKSCR	LRWLNLYLRP	VRRGNITLLE	QFMILKLSL	92
Cpm5	QRWNSLARFA	GLKRTGKSCR	LRWLNLYLRP	VRRGNITLLE	QLLILLELSR	99
Cpm10	QRWNSLARFA	GLKRTGKSCR	LRWLNLYLRP	VRRGNITLLE	QLLILLELSR	99
Cpm7	QRWNSLARFA	GLKRTGKSCR	LRWLNLYLRP	VRRGNITLLE	QLLILLELSR	98

Atmyb2	WGNRWSKIAQ	YLPGRTDNEI	KNYRTRVQK	HAKLCCDVN	SKQFKDTMRY	142
Cpm5	WGNRWSKIAQ	YLPGRTDNEI	KNYRTRVQK	HAKLCCDVN	SKQFKDTMRY	149
Cpm10	WGNRWSKIAQ	YLPGRTDNEI	KNYRTRVQK	HAKLCCDVN	SKQFKDTMRY	149
Cpm7	WGNRWSKIAQ	YLPGRTDNEI	KNYRTRVQK	HAKLCCDVN	SKQFKDTMRY	148

Atmyb2	LWMPRLVERI	NAQSLPTTCE	QVESMITDPS	QPVNEPSPVE	PGFVQFSQNH	192
Cpm5	LWMPRLVERI	QASATTDGGA	PP--AVVSSP	SSAMNTACYI	TAMA--AGCH	195
Cpm10	LWMPRLVERI	QASATTDGGA	PP--AVASSP	SSAMNTACYS	AAMA--AGCH	195
Cpm7	LWMPRLVERI	QRAATTDGGA	PPLASSASSP	SSAMNTACYS	TAMA--AGCH	196

Atmyb2	HQDFV--P--	-----ATE--	-LSA--TSS	NSPAETIFSDV	RGGVVNGSCY	227
Cpm5	RRQFMLPQY	YATTTTTHNN	SMIAQENSST	VASSESEFGL	SSELTAEANY	245
Cpm10	RRQFMLPQY	YATTTTTHNN	SMIAQENSST	VASSESEFGL	SSELTAEANY	245
Cpm7	RRQFMLPQY	YAMTTHSN--	LMIAQENSST	VASSESEFGL	SSELT-EANY	243

Atmyb2	-----DPS	GGTGFGEFN	---DNG---	-CVGGDN---	---M-WTDE	253
Cpm5	ANYHRVINGA	DHQIDSSTI	-SYQNDN---	-CAVGNNGNS	DQLGMGFADD	290
Cpm10	ANYHRVINGA	DHQIDSSTI	-SYQNDN---	-CAVGNNGNS	DQLGMGFADD	290
Cpm7	ANYHQVINGA	DHQIDSSTI	TSYQNDNFA	INTVGNNGNS	DQLGMGSVDD	293

Atmyb2	---ESNFI---	-----	---QDQ---	FC	FDITTSY--SYN---	273
Cpm5	RRSNEQMM	TDDVDNGGS	SDQDNN-LWN	VDDVWFQQF	SSCF	333
Cpm10	RRSNEQMM	TDDVDNGGS	SDQDNN-LWN	VDDVWFQQF	SSCF	333
Cpm7	RRSNEQMM	DD--VDNGGS	SDQDNNLWN	VDDVWFQQF	SSCF	335

Fig. 7. Comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas CpMYB10, CpMYB5, CpMYB7, y AtMYB2. Las regiones correspondientes a las repeticiones R2R3 tipo MYB se encuentran señaladas con asteriscos. Y delimitadas por puntas de flecha. Los puntos negros indican los 31 aminoácidos comunes entre AtMYB2 y las proteínas CpMYB que se encuentran justo al extremo carboxilo del dominio de unión a DNA (tomado de Iturriaga *et al.*, 1996).

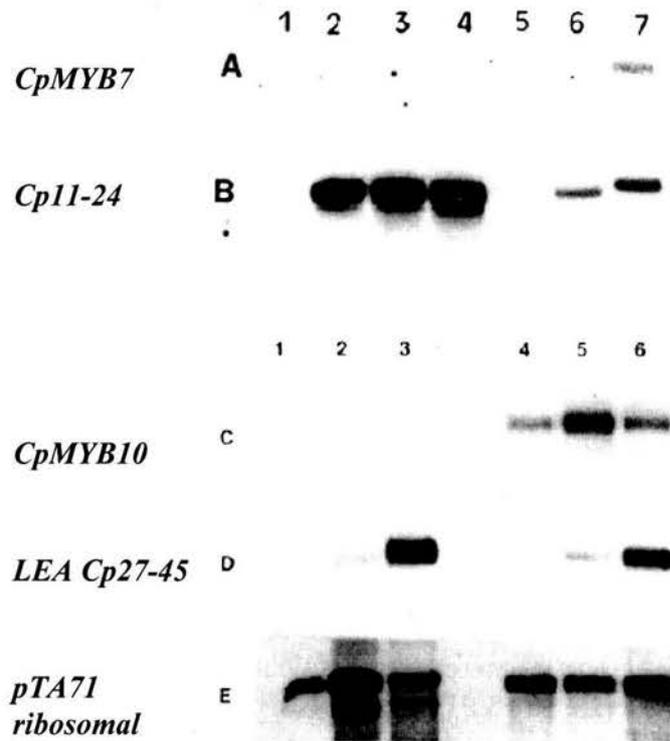


Fig. 8. Patrón de expresión de CpMYB7 y CpMYB10 en *C. plantagineum*. Experimentos tipo Northern de diferentes tejidos. A y B: hojas (1-4), semillas maduras (5), y raíces (6 y 7) de plantas hidratadas (1, 6), incubadas con ABA 100 μ M por 4 días (4), deshidratadas por 2 hrs (2) y deshidratadas por 16 hrs (3, 7). C, D y E: hojas (1-3) y callos (4-6) totalmente hidratados (1, 4), incubados con ABA 100 μ M por 4 días (2, 5), y deshidratados por 2 días (3, 6) (tomado de Iturriaga *et al.*, 1996).

III. OBJETIVOS DEL PROYECTO

Objetivo General:

Estudiar el papel de los genes *CpMYB10*, *CpMYB5* y *CpMYB7* en la regulación de las respuestas a estrés por sequía.

Objetivos específicos:

- 1) Determinar las cinéticas de expresión de los genes *CpMYB10*, *CpMYB5* y *CpMYB7* en hojas y raíces de *Craterostigma* en respuesta a estrés
- 2) Determinar los tipos celulares de hojas y raíces de *Craterostigma* donde se lleva a cabo la expresión de *CpMYB10* y *CpMYB5*.
- 3) Estudiar las regiones promotoras de *CpMYB10* y *CpMYB5* en el fondo genético de *Arabidopsis*.
- 4) Confirmar la función de *CpMYB10* como un factor transcripcional.
- 5) Analizar el efecto de la expresión ectópica de *CpMYB10* en plantas transgénicas de *Arabidopsis*.

IV. METODOLOGIA ADICIONAL

Extracción de proteínas totales de Arabidopsis

Se utilizaron plántulas de Arabidopsis de 2 semanas de edad crecidas in vitro. El tratamiento con ABA (100 μ M) se llevó a cabo durante una hora bajo las condiciones descritas previamente (Villalobos *et al.*, 2004). Por cada condición, alrededor de 20 plántulas fueron congeladas en nitrógeno líquido y pulverizadas en un mortero. Para la extracción de proteínas, por cada muestra se procesaron 10 mg que fueron depositados en tubos eppendorf, mientras que el resto se almacenó a -70°C . Se probaron varios métodos de extracción, pero el que se describe fue el que tuvo mejores rendimientos y limpieza de las muestras. Para la lisis, a cada tubo se le añadió 1 ml de una solución fría de TCA al 10% (preparada en acetona) y 20 mM DTT. Las muestras fueron agitadas vigorosamente (5 min) en vortex, y para la precipitación de las proteínas, se procedió a centrifugar los tubos durante 15 min a 15,000 rpm bajo condiciones de temperatura controlada (4°C). Inmediatamente después, los tubos fueron decantados y la pastilla de proteínas se resuspendió a homogeneidad en una solución fría de acetona con 20 mM DTT. Para facilitar el segundo paso de precipitación, los tubos fueron mantenidos a -20°C durante 1 hr, y posteriormente sometidos a una centrifugación bajo las mismas condiciones anteriormente descritas. Una vez finalizada la centrifugación se procedió a remover el sobrenadante, y las pastillas de proteínas fueron moderadamente deshidratadas al aire. Para resuspender las pastillas, se usó 1 ml de buffer de lisis adicionando 1% de buffer IPG3-10NL (Amersham Biosciences) y con agitación moderada en vortex. Con el fin de desechar el material insoluble de las muestras, los tubos fueron centrifugados de la misma manera ya descrita, y subsecuentemente los sobrenadantes fueron colectados y alicuotados (c/u de 50 μ l) en tubos eppendorf. Las alicuotas fueron almacenadas a -20°C , y una de ellas fue utilizada para la determinación de la concentración de las proteínas utilizando las recomendaciones del fabricante del kit "RC RD Protein Assay" (BIORAD).

Separación de las proteínas por Punto Isoeléctrico.

Para el isoelectroenfoque de las proteínas (1DE, primera dimensión de separación), se utilizaron tirillas "Immobiline DryStrip" (Amersham Biosciences) con rangos de 3-10 ó 4-7 de PI en el formato de 18 cm.

Se utilizaron 100 µg del extracto proteico diluido a 200 µl de volumen final con buffer de rehidratación complementado con 0.5% de buffer IPG (dependiendo del rango de PI deseado se utilizaron los búferes IPG3-10L ó IPG4-7). Esta solución diluida de proteínas fue utilizada para rehidratar las tirillas de inmobilinas dentro de “sarcófagos” de porcelana con electrodos en los extremos, y para el isoelectroenfoque se utilizó el sistema IPGPHOR de Amersham bajo las siguientes condiciones:

S1	30 V por 5 h
S2	60 V por 5 h
S3	120 V por 1 h
S4	250 V por 1 h
S5	500 V por 1 h
S6	1,000 V por 30 min
S7	8,000 V a 32,000 Vh

Separación de las proteínas por Peso Molecular (2DE)

Al finalizar la 1D, se procedió a lavar 2 veces cada tirilla dentro de pipetas desechables de 20 ml recortadas manualmente en ambos extremos, y sellándolos con parafilm cada vez que fue necesario. Antes de proceder con los lavados, cada tirilla fue recortada en su extremo ácido para facilitar su posterior identificación. El primer lavado se efectuó durante 15 min a RT con agitación muy lenta, utilizando 5 ml de buffer de rehidratación complementado con DTT al 1% (el DTT se adicionó por lo menos 15 minutos antes de proceder con el lavado y se resuspendió con agitación moderada). El segundo paso para equilibrar las tirillas fue conducido de la misma manera que el anterior, solo que aquí se utilizaron 5 ml de búfer de rehidratación adicionando minutos antes 0.4% de iodo acetamida. Finalmente, las tirillas fueron enjuagadas 2 veces con agua milliQ (10 segundos c/u) antes de ser colocadas dentro de un gel de acrilamida. En caso de ser requerido, las tirillas fueron depositadas sobre papel Whatmann 3MM humedecido con agua milliQ (con la cara de las inmobilinas hacia arriba) y cubiertas cuidadosamente con megapack para ser almacenadas a 4°C (nunca más de 24 hrs) hasta su posterior procesamiento.

Dependiendo de la zona de PM a analizar, se utilizaron geles de acrilamida al 10% ó al 12.5% preparados bajo condiciones estándar, dejando un espacio libre de aproximadamente 1 cm en la parte superior para permitir la colocación de la tirilla. El tamaño de los geles utilizados fue de 18X18 cm. Los geles fueron corridos en búfer SDS de electroforesis al 1X. Las condiciones generales de corrida fueron 90V y 20 mA durante toda la noche (+/- 16 hrs).

La visualización de las proteínas se llevo a cabo mediante la tinción con nitrato de plata, utilizando el kit "Silver Staining Kit PlusOne" siguiendo las instrucciones del fabricante (Pharmacia Biotech).

Identificación molecular de las proteínas de interés

Para la identificación de las proteínas se utilizó un espectrómetro de masas tipo MALDI-ToF ("matrix assisted laser desorption ionization-time of flight") modelo REFLEX IV de la marca Bruker-Daltonics. Después de analizar los geles de doble dimensión, se precedió a seleccionar y recortar las proteínas de interés manualmente. Los pedazos de gel (1-2 mm de diámetro) fueron depositados en placas con formato de 96 pozos para su procesamiento. Dichos fragmentos de gel (cada uno conteniendo una proteína de interés) fueron desteñidos, reducidos, alquilados, y digeridos con tripsina (Promega), para posteriormente extraer los péptidos, siguiendo las recomendaciones de Kinter y Sherman (2000). Para favorecer su cristalización, los péptidos resultantes de cada digestión fueron mezclados con la matriz conocida como ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Aldrich), y las alícuotas de cada digestión fueron dispensadas en pequeñas cantidades (2-4 μ l) sobre las placas del MALDI con formato de 384 pozos. Las placas del MALDI que contenían las muestras fueron introducidas al equipo, y cada muestra fue sometida al menos a 25 bombardeos de láser. Para la identificación de las proteínas, los espectros de masas resultantes del análisis fueron comparados con la base de datos de digestiones teóricas de proteomas del NCBI (MASCOT).

Soluciones:

Búfer de Lisis:

Urea	8.4 M
Tiourea	2.4 M
CHAPS	5 %
BPB	solo unos granitos
TCEP-HCl*	2 mM
IPG buffer pH3-10L*	1% (Amersham Biosciences)

*Añadir al momento de usar

Búfer de Rehidratación:

Urea	8 M
Tiourea	2 M
CHAPS	2 %
BPB	solo unos granitos
TCEP-HCL*	1 mM (a partir de un stock 100 mM)
IPG búfer L**	0.5 % (Amersham Biosciences)

* Añadir en el momento de usar

** pH dependiente de la tirilla a usar.

V. RESULTADOS

V.1. Artículo publicado de este trabajo de tesis.

Miguel Angel Villalobos, Dorothea Bartels, Gabriel Iturriaga. (2004). Stress Tolerant and Glucose Insensitive Phenotypes in Arabidopsis Overexpressing the *CpMYB10* Transcription Factor Gene. *Plant Physiology*. 135: 309-324.

Stress Tolerance and Glucose Insensitive Phenotypes in *Arabidopsis* Overexpressing the *CpMYB10* Transcription Factor Gene¹

Miguel Angel Villalobos, Dorothea Bartels, and Gabriel Iturriaga*

Instituto de Biotecnología-UNAM, Cuernavaca 62210, Mexico (M.A.V.); Institute of Physiology and Biotechnology of Plants, D-53115 Bonn, Germany (D.B.); and Centro de Investigación en Biotecnología-UAEM, Cuernavaca 62210, Mexico (G.I.)

The resurrection plant *Craterostigma plantagineum* has the ability to survive complete dehydration. In an attempt to further understand desiccation tolerance in this plant, the *CpMYB10* transcription factor gene was functionally characterized. *CpMYB10* is rapidly induced by dehydration and abscisic acid (ABA) treatments in leaves and roots, but no expression was detected in fully hydrated tissues. Electrophoretic mobility shift assay experiments showed binding of rCpMYB10 to specific *mybRE* elements within the LEA *Cp11-24* and *CpMYB10* promoters. Localization of *CpMYB10* transcript by in situ reverse transcription-PCR reactions showed expression in vascular tissues, parenchyma, and epidermis both in leaves and roots in response to ABA. Transgenic *Arabidopsis* plants transformed with *CpMYB10* promoter fused to *GUS* gene showed reporter expression under ABA and stress conditions in several organs. Overexpression of *CpMYB10* cDNA in *Arabidopsis* led to desiccation and salt tolerance of transgenics lines. Interestingly, it was found that plants overexpressing *CpMYB10* exhibited Glc-insensitive and ABA hypersensitive phenotypes. Therefore, our results indicate that *CpMYB10* in *Arabidopsis* is mediating stress tolerance and altering ABA and Glc signaling responses.

Diurnal and seasonal environmental fluctuations as well as extreme conditions have been a major selective pressure for plant evolution. Plants are sessile organisms that cannot move to escape from adverse environmental cues, thus complex metabolic and anatomical adaptations have been developed to cope with abiotic stresses. Availability of water is probably the most limiting factor for crop productivity and yield, compromising economical output and human food supply. Therefore, there is a strong need to understand plant adaptation mechanisms against adverse environmental conditions to improve stress tolerance.

Plant stress responses involve the expression of a plethora of genes with an adaptive role. Among the products of these genes are enzymes catalyzing the synthesis of osmoprotectants or antioxidants, late-embryogenesis abundant (LEA) proteins, chaperones and heat shock proteins, lipid desaturases, water channels, and ion transporters, representing some of the best characterized examples (Ingram and Bartels, 1996). Abscisic acid (ABA) plays a major role in transducing stress responses (Knight and Knight, 2001).

Rapid stress responses are in most cases ABA-independent, and there is growing evidence that ABA-dependent and independent pathways cross-talk (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Signal transduction components include protein kinases such as calcium-dependent protein kinases (CDPK) and mitogen-activated protein (MAP) kinases, G-proteins, phosphatase 2C, and second messengers such as Ca²⁺ and phosphoinositides. A phospholipase D raises its activity minutes after dehydration (Frank et al., 2000). Also, within 1 min after osmotic shock, inositol 1,4,5-P₃, a breakdown product of phospholipase C, dramatically increases its concentration, and rapid changes in cytosolic free Ca²⁺ concentrations are triggered during this process (DeWald et al., 2001). It has been claimed that nitric oxide is involved in ABA-induced response to stomatal closure and requires cGMP and cADPR (Neill et al., 2002). An *Arabidopsis* transmembrane His kinase functions as an osmosensor in a yeast mutant, suggesting a similar role in plants (Urao et al., 1999).

Several plant model systems have been used to study responses to water deficit, according to the severity of the stress. Upon a mild water deficit, plants reduce water loss by closing stomata, retain water by osmotic adjustment, and increase water uptake. These responses have been thoroughly studied in *Arabidopsis* and other mesophytes (Tabaeizadeh, 1998). A different situation occurs in the so-called resurrection plants that exhibit protoplasmic desiccation tolerance. These organisms withstand long periods with air of 0% (v/v) relative humidity, reviving a few hours after

¹ This work was supported in part by CONACYT (grant no. 27703-N [Mexico] to G.I.) and by ICGEB (grant no. CRP/MEX98-01 [Trieste] to G.I.). M.A.V. was supported by a CONACYT PhD fellowship.

* Corresponding author; e-mail iturri@cib.uaem.mx; fax 52-777-3297030.

Article, publication date, and citation information can be found at www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.103.034199.

exposure to water. The best characterized example is *Craterostigma plantagineum*, a South African plant living on rocks in shallow soil (Gaff, 1971). An important question is whether the biochemical and molecular mechanisms to cope with dehydration stress that are present in *Arabidopsis*, crops, or seeds are also in *Craterostigma*. Although some common molecular components have been found in all these plants, in mature seeds or *Craterostigma* some differences with other systems have been uncovered, such as the presence of large concentrations of sugars (Bartels and Salamini, 2001). The C8 sugar octulose is very abundant in fully hydrated leaves of *Craterostigma*, but as soon as desiccation proceeds its concentration drastically drops down and concomitantly Suc reaches high levels. Disaccharides such as Suc or trehalose have been shown to protect enzymes and membrane structures under the dehydrated state and are abundant in anhydrobiotic organisms (Crowe et al., 1998; Hoekstra et al., 2001).

Another potential difference between *Craterostigma* and *Arabidopsis* might be the pattern of gene regulation coordinated by transcriptional activators and their tissue-specificity. Genetic and molecular approaches have identified transcription factors that modulate gene expression in response to abiotic stress and ABA. The transcription activators DREB1A, DREB2A, and CBF1, involved in ABA-independent stress response, bind to the consensus dehydration-responsive element (DRE) TACCGACAT, which is present in promoter regions of genes induced by osmotic, saline, and cold stresses (Stockinger et al., 1997; Liu et al., 1998). Genes responsive to ABA usually contain ABA-responsive elements consisting of the (C/T)ACGTGGC consensus sequence and are transactivated by bZIP transcription factors (Choi et al., 2000). Three classes of transcription factors have been characterized in *Craterostigma*: a heat shock transcription factor (Bockel et al., 1998), two members of the homeodomain Leu zipper family (Frank et al., 1998), and three MYB genes (Iturriaga et al., 1996). Here we show that *Arabidopsis* transgenic

lines overexpressing the heterologous MYB transcription factor gene *CpMYB10* are stress tolerant, Glc-insensitive, and ABA hypersensitive. The expression pattern of *CpMYB10* in *Craterostigma* suggests a key role in desiccation tolerance.

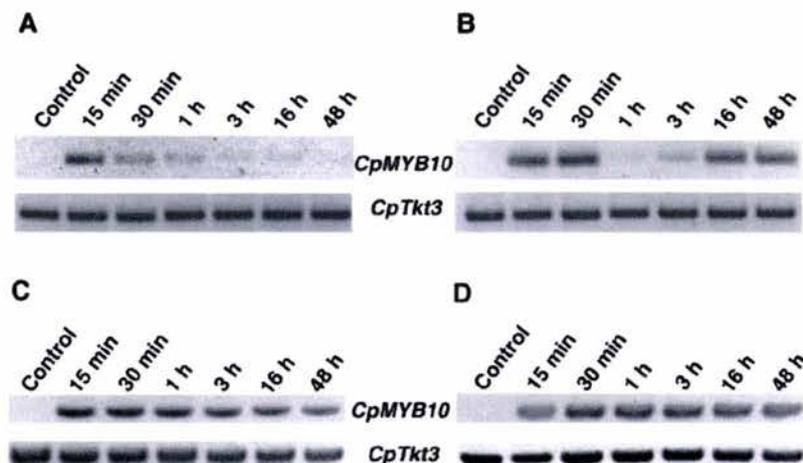
RESULTS

CpMYB10 Gene Is Induced by Desiccation and ABA and Is Under Repression Control in Unstressed Conditions

We have previously reported the cloning of a cDNA and two genomic MYB genes from *Craterostigma* (Iturriaga et al., 1996). The *CpMYB7* cDNA and *CpMYB5* and *CpMYB10* genomic clones share between them 96% to 98% identity and have the canonical MYB DNA-binding domain with the R2R3-type structure that is predominant in plants (Stracke et al., 2001). In *Arabidopsis*, the closest homolog to these MYB genes from *Craterostigma* is *AtMYB2*, which is induced by ABA, dehydration, and salt stresses (Urao et al., 1993). Although the DNA-binding domain of *CpMYB10* and *AtMYB2* shares 92% similarity, the 230-amino acid C terminus of *CpMYB10* is different from the corresponding *AtMYB2* region, except for a stretch of 31 amino acids that shows 87% similarity (Iturriaga et al., 1996).

To test whether *CpMYB10* is expressed in leaves and roots, a reverse transcription coupled to PCR (RT-PCR) analysis was used. Specific oligonucleotides for the 5' and 3' untranslated region of *CpMYB10* gene were used in this expression analysis. To confirm specific amplification of *CpMYB10* cDNA, the amplification product was cloned and sequenced. As shown in Figure 1, A and B, *CpMYB10* is induced upon desiccation in leaves and roots, respectively. No expression could be detected in unstressed organs. Since detached leaves were used for these experiments, the absence of expression also suggests that *CpMYB10* is not induced by wounding. Both in leaves and roots the *CpMYB10* transcript is detected at significant levels 15

Figure 1. Expression of *CpMYB10* is regulated by drought and ABA. A, Total RNA was isolated from dehydrated *Craterostigma* leaves at the indicated times and the expression of *CpMYB10* was determined by coupled RT and PCR. The PCR product of *CpTkt3* gene was included as a cDNA loading control. B, RNA from dehydrated roots. C, RNA from leaves treated with 100 μ M ABA. D, RNA from roots treated with 100 μ M ABA. Specific primers were used to amplify *CpMYB10* and *CpTkt3* gene transcripts. The lengths of the PCR products are 1,117 and 733 bp, respectively. The linear phase of the exponential PCR reaction was corroborated for each gene (data not shown). A representative experiment from three biologically independent experiments is shown.



min after dehydration suggesting that its expression began earlier. In leaves, *CpMYB10* reaches its maximum level at about 15 min, sharply declining thereafter and is absent 48 h after stress treatment began (Fig. 1A). The *CpTkt3* gene that encodes a transketolase (Bernacchia et al., 1995) was used as a control for constitutive expression.

In desiccated roots, *CpMYB10* has a biphasic expression pattern where a first transcript peak is observed from 15 to 30 min after stress was initiated and drastically declining after 1 h (Fig. 1B). A second burst of *CpMYB10* expression was observed 16 h after desiccation treatment at similarly high levels as the first peak, and it is maintained during the 48 h of the experimental time course. To determine if *CpMYB10* expression is induced by ABA, fully hydrated plants were treated with 100 μM ABA at same time points as above (Fig. 1, C and D). In contrast to desiccation treatment, ABA switches on *CpMYB10* at constant levels both in leaves and roots after 15 min of treatment and continues up through 48 h. These two sets of experiments show that *CpMYB10* is induced by desiccation and ABA, although its differential expression pattern upon ABA treatment suggests that the endogenous and exogenous ABA signals are sensed differently during the desiccation treatment.

To test whether *CpMYB10* expression depends on de novo protein synthesis, fully hydrated *Craterostigma* leaves were incubated in the presence of the protein synthesis inhibitor cycloheximide (CHX) and/or ABA at different time points. The LEA *Cp11-24* gene was used as a control of ABA treatment (Velasco et al., 1998). As shown in Figure 2A, CHX treatment blocked completely *Cp11-24* gene expression, suggesting its dependence on de novo protein synthesis. Surprisingly, *CpMYB10* expression was not inhibited but rather induced with CHX treatment (Fig. 2A) at relatively higher levels after comparison to its induction by ABA (Fig. 2B). Control experiments showed that ABA induced expression of *CpMYB10* was present 15 min after treatment, whereas *Cp11-24* was not detected until 1 h after ABA exposure (Fig. 2B). This delay in *Cp11-24* expression may be due to the fact that it requires de novo protein synthesis, as suggested by Figure 2A. Incubation of *Craterostigma* leaves in the presence of both CHX and ABA resulted in higher levels of *CpMYB10* expression than in ABA alone, whereas LEA *Cp11-24* transcription was restored although only after 16 h of ABA treatment (Fig. 2C). These results showed that *CpMYB10* does not require prior protein synthesis for its expression, instead inhibition of translation triggers *CpMYB10* transcription, suggesting that somehow it is repressed under unstressed conditions.

CpMYB10 Protein Binds to *Cp11-24* and *CpMYB10* Promoters

To study the DNA-binding properties of CpMYB10 protein, its cDNA was expressed in *Escherichia coli* as

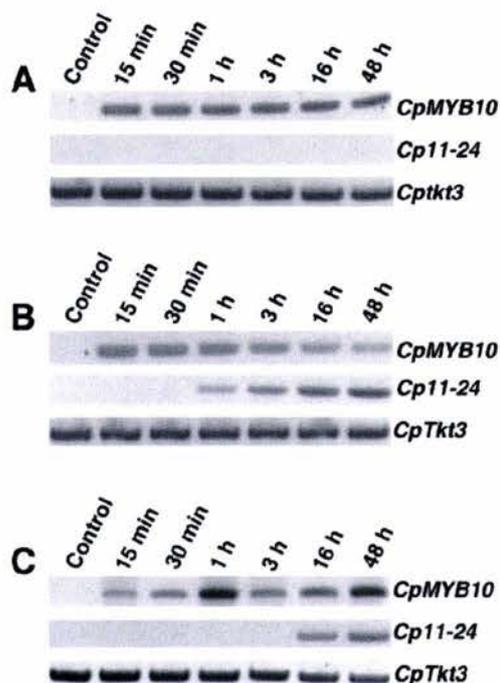


Figure 2. Expression of *CpMYB10* in the presence of cycloheximide. A, Total RNA was isolated from *Craterostigma* leaves treated with 10 μM cycloheximide at the indicated times and the expression of *CpMYB10* was determined by coupled RT and PCR. The *Craterostigma* LEA gene *Cp11-24* was included in the experiment as a control of ABA treatment, whereas *CpTkt3* was used as a cDNA loading control. B, *Craterostigma* leaves were treated with 100 μM ABA. C, *Craterostigma* leaves were treated with 100 μM ABA and 10 μM cycloheximide. Specific primers were used to amplify *CpMYB10*, *Cp11-24*, and *CpTkt3* gene transcripts. The lengths of the PCR products are 1,117, 629, and 733 bp, respectively. The linear phase of the exponential PCR reaction was corroborated for each gene (data not shown). A representative experiment from three biologically independent experiments is shown.

a fusion protein to a hexapeptide of His residues. The purified recombinant protein was used to perform gel mobility shift assays with double-strand oligonucleotide probes ^{32}P labeled. These probes contained the MYB binding sequence found in the LEA *Cp11-24* (Velasco et al., 1998) and *CpMYB10* (Iturriaga et al., 1996) gene promoters of *Craterostigma*. The consensus DNA-binding recognition sequence of several plant MYB genes including *AtMYB2* has been defined as T/GAACTG/A (Urao et al., 1993; Higo and Ugawa, 1999). Three TAACTG elements and a GAACTA sequence were found in *CpMYB10* and *Cp11-24* promoter regions, respectively. Each DNA motif was included in either MYB-P10 or MYB-P11-24 oligonucleotide probes. To analyze the binding affinity of recombinant MYB protein (rCpMYB10) to MYB-P10 and MYB-P11-24 probes, the optimal concentration of required protein was determined (data not shown). Figure 3A shows binding of rMYB10 protein to MYB-P10 probe. To analyze the specificity of the DNA binding activity, a mutated form of MYB-P10 was used

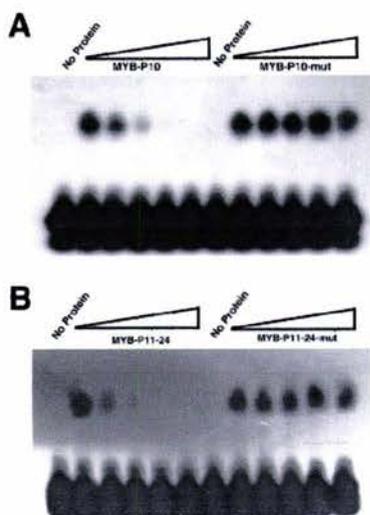


Figure 3. DNA-binding assays of rCpMYB10 protein. A, Purified recombinant rCpMYB10 protein expressed in *E. coli* was used in EMSA assays. Complementary 20-nucleotide length primers corresponding to the MYB-P10 DNA-binding region were used as 32 P-labeled probe. Unlabeled mutant (MYB-P10-mut) and unmodified versions of primers were used to compete radioactive probe. The concentrations used in the competition represented by the triangles were 0, 5, 25, 125, and 625 ng. B, EMSA assays using MYB-P11-24 DNA-binding region as a 32 P-labeled probe. Unlabeled mutant (MYB-P11-24-mut) probe was used for competition.

(MYB-P10-mut) as well as MYB-P10 as probes (Fig. 3A). The MYB-P10-mut oligonucleotide contained two point mutations in the MYB binding site (TCCCTG instead of TAACTG). In the electrophoretic mobility shift assay (EMSA), the DNA binding activity rMYB10 protein was reduced by the addition of excess unlabeled MYB-P10 but not by that of unlabeled MYB-P10-mut. Thus, rMYB10 protein bound to MYB-P10 but not to MYB-P10-mut. These results indicate that rMYB10 binds specifically to the MYB-P10 oligonucleotide probe and suggests that CpMYB10 protein binds to its own promoter.

To further characterize the DNA binding properties of rCpMYB10 protein, it was incubated with MYB-P11-24 probe and used to perform an EMSA, as shown in Figure 3B. Unlabeled competitor MYB-P11-24 decreased rCpMYB10 protein binding activity, whereas a mutated form of MYB-P11-24, MYB-P11-24-mut (GCCCTA instead of GAACTA), was unable to compete for protein binding. Therefore, rCpMYB10 protein also binds specifically to MYB-P11-24 probe, suggesting that the LEA 11-24 might be a possible target gene.

Expression of *CpMYB10* Is Localized in Discrete Tissues in *Craterostigma*

The expression pattern of *CpMYB10* was further investigated by in situ RT-PCR analysis in *Craterostigma*. Leaf and root tissue sections obtained from

control or 100 μ M ABA pretreated plants were processed for in situ RT-PCR reactions, which yields high-resolution specific mRNA amplification signals in plant tissues (Xoconostle-Cázares et al., 1999). Red chlorophyll autofluorescence was superimposed with the green signal produced by the in situ RT-PCR reaction, leading to a yellow fluorescence (Fig. 4). In untreated leaves, *CpMYB10* amplification products were visible at low levels in epidermis, in some parenchyma cells, and in the vascular bundle central region (Fig. 4A). In contrast, PCR products in ABA treated leaves were detected at higher levels in epidermis, palisade, and spongy parenchyma, and vascular bundle and undetectable in trichoma (Fig. 4B). ABA treated roots showed a more discrete pattern of *CpMYB10* expression, limited to vascular cylinder and some isolated cortex cells (Fig. 4D). No fluorescent PCR products were detected in untreated roots (Fig. 4C). It was not possible to perform in situ RT-PCR assays from dehydrated plants since tissue sections were difficult to handle.

CpMYB10 Promoter Is Regulated in Transgenic Arabidopsis

More detailed expression patterns of *CpMYB10* under stress and ABA treatments were determined by histochemical β -glucuronidase (GUS) staining of Arabidopsis transgenic plants that harbored a *CpMYB10* promoter-GUS fusion construct. Three independent T3 homozygous (9.2, 11.1, and 13.5) lines with similar performance in response to ABA and dehydration were analyzed. In unstressed transgenic plants, GUS activity was detected in apical shoot meristem at low levels (Fig. 5A) and in pollen grains (Fig. 5B). After subjecting transgenic plants to 100 μ M ABA treatment, a strong staining was observed in all vegetative tissues (Fig. 5C), although staining was stronger in the subapical region of roots and no staining was visible in root tip (Fig. 5D). Dehydration treatment led to a more localized staining, mainly in leaf vascular tissues and conspicuously strong in apical shoot meristem, emerging leaves, and roots (Fig. 5E). In contrast to ABA treatment, dehydration led to a stronger GUS activity in the root tip (Fig. 5F). These results strongly suggest that in transgenic Arabidopsis the *CpMYB10* promoter is regulated by ABA and dehydration as in *Craterostigma*.

To have a quantitative analysis of *CpMYB10* promoter strength in Arabidopsis, GUS activity was determined by fluorimetric assays. Transgenic plants 3, 6, 15, and 21 d after germination were dehydrated, treated with 100 μ M ABA, or unstressed to measure GUS activity. No significant GUS activities were detected in untransformed Arabidopsis plants (dehydrated, ABA treated, or untreated) at the developmental stages analyzed. GUS activity in unstressed transgenic plants exhibited similarly low levels at different ages, basal expression was around 10% to 30% of that observed for ABA or dehydrated plants of

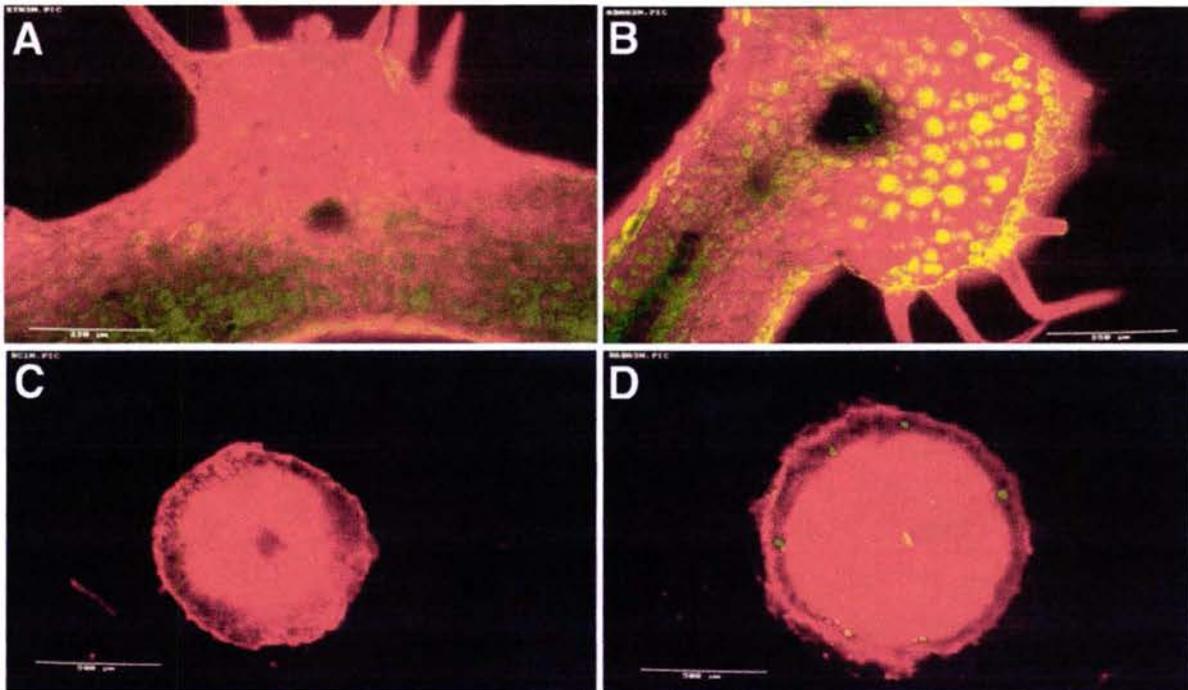


Figure 4. Tissue localization of *CpMYB10* expression in *Craterostigma*. A, Confocal laser scanning microscope images of transverse sections from fully hydrated *Craterostigma* leaves or B, treated with 100 μM ABA. C, Tissue sections of fully hydrated *Craterostigma* roots or D, treated with 100 μM ABA. The sections were processed for in situ coupled RT and PCR using specific *CpMYB10* primers. Overlaps of green and red fluorescence from the same field of view are presented. Bars = 500 μm . A representative experiment from at least three biologically independent experiments is shown.

3 to 21 d old. This basal β -glucuronidase activity is consistent with the histochemical GUS staining described above (Fig. 5A). As shown in Figure 5G, ABA treatment induced the highest levels of GUS activity, reaching a peak in 6-d-old plants. In 15-d-old plants, ABA induced GUS activity was 25% greater than that observed in dehydration stress. The maximum level of GUS activity induced by dehydration was seen in the leaves of 21-d-old plants. Only in roots were levels caused by dehydration greater than those of ABA treatment (Fig. 5G).

Ectopic Expression of *CpMYB10* Gene Confers Stress Tolerance in *Arabidopsis*

To investigate the *in vivo* function of *CpMYB10*, its cDNA was overexpressed in *Arabidopsis* using the 35S promoter. Thirty independent T2 lines, named 35S-*CpMYB10*, were recovered and checked by RT-PCR for *CpMYB10* expression and 10 T3 homozygous lines were corroborated by RNA gel blot (Fig. 6). Eight T3 homozygous lines showing transgene expression were used for stress tolerance tests. Representative lines 11.5, 17.1, 9.3, 22.5, and 7.6 with decreasing levels of *CpMYB10* transcript were further analyzed. Comparison of 35S-*CpMYB10* lines with wild-type plants showed no morphological alterations or growth re-

tardation except for a bulky root system in transgenic lines that was clearly visible in 3-week-old plants (data not shown). The germination rate of wild-type and 35S-*CpMYB10* lines was assayed in Murashige and Skoog (MS) (1962) media containing different concentrations of osmoticum compounds. Germination was defined as radicle emergence. The sharpest differences were observed in media containing 200 mM NaCl or 400 mM sorbitol (Fig. 7). After 2 d in 200 mM NaCl, 60% to 70% of 5 selected 35S-*CpMYB10* lines had already germinated compared to 30% of wild-type plants (Fig. 7A). In media containing 400 mM sorbitol, 90% of 35S-*CpMYB10* lines germinated in contrast to only 40% of wild-type seedlings (Fig. 7B). After 5 d, close to 100% and around 90% of transgenic and wild-type seedlings, respectively, germinated in both treatments. All lines germinated at the same rate in the absence of osmoticum compounds. These results showed a faster rate of germination of *Arabidopsis* lines overexpressing *CpMYB10* gene in osmotic stress conditions. In a further experiment, transgenic seeds were germinated media and grown for 4 weeks in high osmoticum media. As shown in Figure 8A, plants from the representative 11.5 line grew normally in 250 mM NaCl, whereas wild-type plants became chlorotic and died. In 500 mM sorbitol, transgenic line 11.5 grew poorly but better than wild-type plants (Fig. 8A).

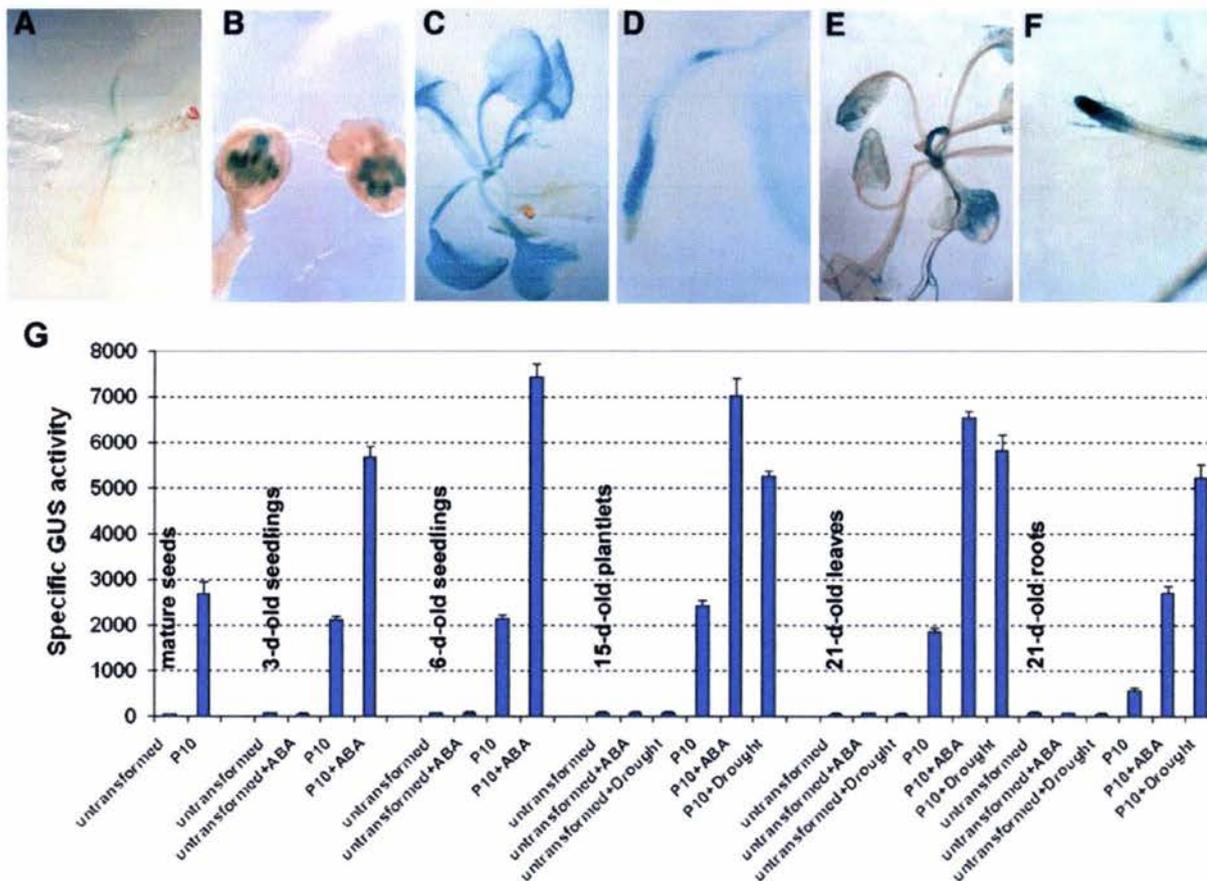


Figure 5. Expression pattern of *CpMYB10* in transgenic Arabidopsis. Three-week-old plants of a representative transgenic Arabidopsis line (9.2) carrying a 1.5-kb *CpMYB10* promoter-GUS construct were processed for histochemical GUS staining (A–F). β -Glucuronidase activity is visualized by the blue color. A, Unstressed plants. B, Anthers from unstressed plants. C, Plants treated with 100 μ M ABA. D, Roots from plants treated with 100 μ M ABA. E, Dehydrated plants. F, Roots from dehydrated plants. G, Quantification of β -Glucuronidase activity in mature seeds, and different developmental stages of untreated or 100- μ M ABA-treated seedlings for 16 h or seedlings subjected to dehydration. Treated and untreated untransformed plants were included as negative controls. The results are means of GUS activities from three independent experiments with a repetition in each experiment. Specific GUS activities are expressed as pmol of 4-methylumbelliferone per mg of total protein per min.

To assess if the overexpression of the *CpMYB10* gene conferred stress tolerance, drought and salt tolerance tests in adult plants grown in soil were performed. Plants from five selected 35S lines were grown for 4 weeks under fully watered conditions followed by 2 weeks of water deprivation. As shown in Figure 8B, most 35S-*CpMYB10* lines recovered water deprivation after rewatering, whereas wild-type plants did not survive this treatment. To test for salt-stress tolerance, transgenic plants overexpressing *CpMYB10* were grown with increasing concentrations of salt up to 250 mM NaCl. Figure 8C shows that transgenic plants grew well, whereas wild-type plants are wilted and chlorotic. Plants from transgenic lines under both treatments continued normal growth and set viable seeds. These results suggest that the overexpression of *CpMYB10* gene in Arabidopsis could be up-regulating genes involved in stress tolerance.

Altered Response to Glc and ABA in 35S-*CpMYB10* Plants

Several reports have documented that mutations in ABA-insensitive-4 (*ABI4*) transcription factor gene led to a Glc-insensitive phenotype (Arenas-Huertero et al., 2000) and displayed salt and osmotic stress tolerance during germination (Quesada et al., 2000), thus suggesting a cross-talk between signaling pathways for stress tolerance, ABA, and Glc. In an effort to further characterize our transgenic plants overexpressing *CpMYB10* and test their germination in response to Glc, seeds from 7.6, 9.3, 11.5, 17.1 and 22.5 *CpMYB10* transgenic lines were germinated in MS media supplemented with various concentrations of Glc and allowed to grow for 10 d. In Figure 9A it can be observed that MS medium supplemented with 6.5% or 7.5% Glc, or 2% Glc without MS salts, have a

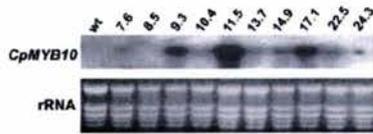


Figure 6. Analysis of *CpMYB10* expression in transgenic Arabidopsis. Northern blot from Col wild-type and several transgenic lines (line number on top of the figure) grown for 15 d on MS medium. Each lane contains 10 μ g of total RNA. The complete 1.1-kb *CpMYB10* cDNA was used as a probe. On bottom part of the figure rRNAs are shown as a loading control.

detrimental effect in development of wild-type seedlings, whereas no effect could be detected in the representative 11.5 transgenic line that showed cotyledon expansion and greening. A low concentration of Glc without MS salts was tested to discard a possible effect of nitrate on germination since it is known to antagonize Glc responses (Moore et al., 2003). Thus, germination of *CpMYB10* transgenic lines on 2% Glc without MS supports the observation that it is caused by Glc and it is not an osmotic effect. This Glc-insensitive phenomenon was further characterized by comparing the germination rate on different Glc concentrations, of wild-type and five selected 35S-*CpMYB10* transgenic lines, as shown in Figure 9B. The largest differences in germination rate were observed after 2 d on media containing 6.5% Glc, where more than 50% of transgenic lines initiated root emergence and elongation, whereas less than 5% of wild-type seedlings had germinated on the same conditions. On 7.5% Glc, germination rate of transgenic lines after 2 d was roughly 30%, whereas the germination rate in wild-type seedlings was near 5%. All these results indicated that overexpression of *CpMYB10* gene confers Glc insensitivity in Arabidopsis.

Glc analogs have been used to discriminate the sugar signaling pathway involved in specific responses such as germination, cotyledon expansion, and greening as well as gene expression. 2-deoxy-Glc (2-DG) has been shown to trigger a potent sugar response even at very low concentrations compared to Glc. For example, 2-DG strongly represses photosynthetic gene expression as well as photosynthetic efficiency (Jang and Sheen, 1994; Van Oosten et al., 1997) in an HXK mediated manner. To get insight into the sugar signaling pathway altered in *CpMYB10* overexpressing lines, we examined greening and expansion of cotyledons, known to be inhibited by a low 2-DG concentration (0.8 mM; Jang et al., 1997). As in the Glc assay, the 35S-*CpMYB10* lines were 2-DG hyposensitive and appeared green and had more expanded cotyledons compared to wild-type plants (Fig. 9A). The rest of the transgenic lines expressing *CpMYB10* showed similar phenotypes, although at different degrees, most likely due to variations in transgene expression. Additionally, the *ABI4* gene, involved in sugar and ABA signaling (Arenas-Huertero et al., 2000), has been shown to participate in the

HXK-dependent sugar signaling (Pego et al., 1999; Van Oosten et al., 1997); thus we included the *abi4* mutant in our sugar bioassays. Interestingly, this mutant also showed 2-DG hyposensitivity in this assay, confirming its participation in this sugar signaling pathway. Together, these data suggest that the *CpMYB10* overexpressing lines are affected at least in part in the hexose phosphorylation-dependent sugar signaling, and also indicate that Glc resistance of these lines can be separated from their osmotic resistance.

As mentioned above, there is strong evidence for a cross-talk of Glc and ABA signaling pathways (Arenas-Huertero et al., 2000; Huijser et al., 2000; Laby et al., 2000). Therefore, we decided to investigate the ABA sensitivity of *CpMYB10* transgenic lines. As shown in Figure 10A, an ABA dose response curve in germination was conducted, which showed that 3 μ M ABA was sufficient to inhibit 35S-*CpMYB10* lines germination efficiency to 20% or less, whereas wild-type plants retained 50% germination under the same

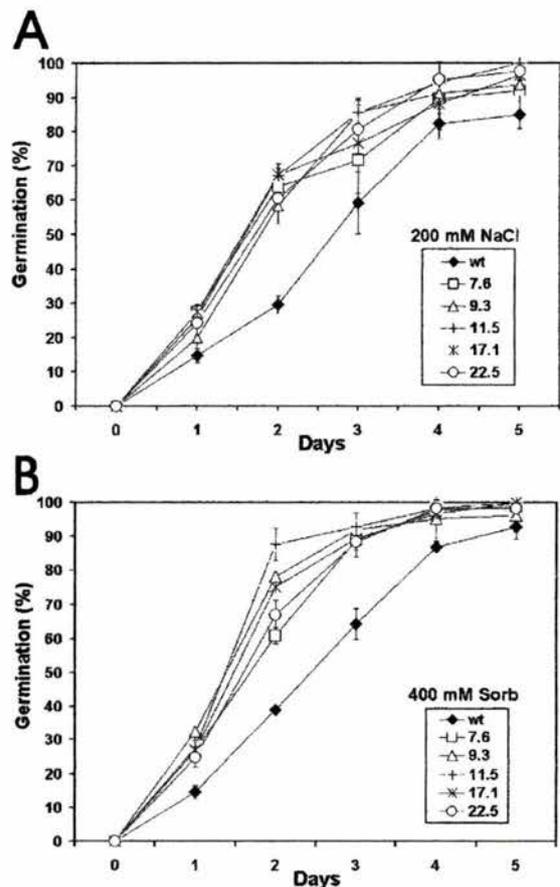


Figure 7. Kinetics of germination of 35S-*CpMYB10* lines. A, Growth of transgenic plants on MS media added with 200 mM NaCl. B, Growth of transgenic plants on MS media added with 400 mM sorbitol. The figure represents the average of 3 replicates of 100 seeds from wild-type and 5 independent transgenic (T3 generation) homozygous lines. Error bar represents sds. Germination was defined as complete protrusion of the radicle.

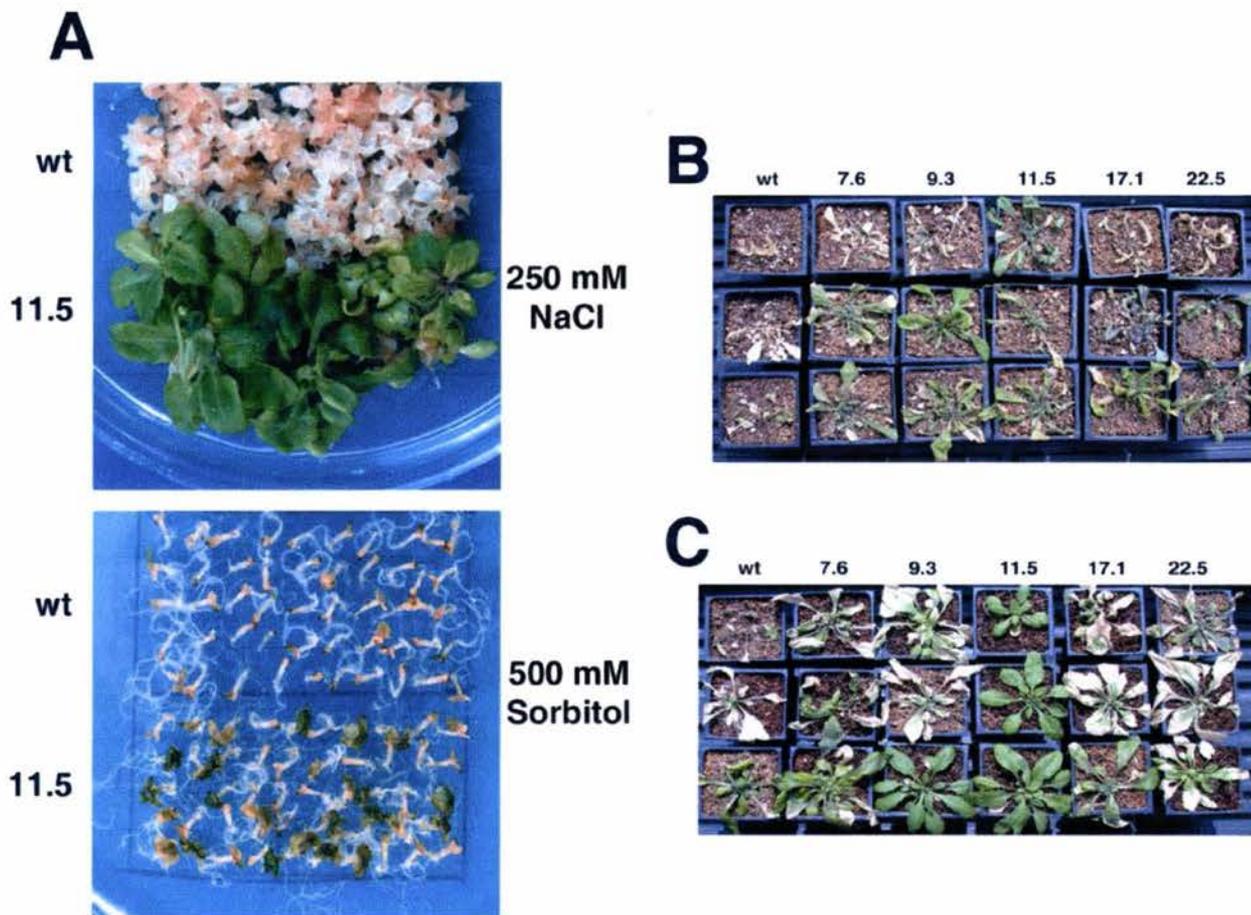


Figure 8. Salt and drought tolerance of *35S-CpMYB10* plants. A, Wild-type and 11.5 transgenic seeds were germinated on MS media containing 250 mM NaCl or 500 mM sorbitol during 4 weeks. B, Wild-type and five independent (T3 generation) homozygous lines expressing the *35S CpMYB10* transcript were withheld from water for 14 d and then rewatered before being photographed. C, Wild-type and five independent *35S-CpMYB10* lines were stressed with increasing concentrations of NaCl (50, 100, 150, 200, and 250 mM). Three plants per line are shown. See "Materials and Methods" section for details.

conditions. The line 11.5 showed 10% of germination rate at $3 \mu\text{M}$ ABA. Additional evidence was gathered by a germination kinetics experiment using $3 \mu\text{M}$ ABA, where selected lines of *CpMYB10* seeds had only about 10% germination after 1 d. In contrast, 50% germination was observed in wild-type seeds, as shown in Figure 10B. These results indicated that overexpression of *CpMYB10* gene in *Arabidopsis* conferred hypersensitivity.

CpMYB10 Regulates Stress Related Genes in *Arabidopsis*

So far, we have shown that overexpression of *CpMYB10* confers osmotic stress tolerance, Glc insensitivity, and ABA hypersensitive phenotypes in *Arabidopsis*. Since *CpMYB10* is a transcription factor, it might be modulating the expression of genes involved in these processes. To test this hypothesis, gene expression analysis of possible regulated genes in 11.5 and 22.5 transgenic lines was carried out by RNA

gel blot (Fig. 11). We selected the following genes for expression analysis: *AtEM6* (Vicent et al., 2000) and *ERD10* (Kiyosue et al., 1994), which correspond to LEA group I and group II genes, respectively; dehydration- and ABA-responsive genes *RD29A*, *RD29B*, and *RD22* (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 1993, 1994); cold-responsive gene *COR15a* (Baker et al., 1994), Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene *P5CS1* (Yoshida et al., 1999), alcohol dehydrogenase gene *ADH1* (de Bruxelles et al., 1996), and transcription factor genes *AtMYB2* (Urao et al., 1993), *AtMYC2* (Abe et al., 1997), *DREB1A*, and *DREB2A* (Liu et al., 1998) as they are involved in stress response; hexokinase gene *HXK2* (Jang et al., 1997) and Suc synthase gene *SUS1* (Martin et al., 1993) for their role in sugar sensing and metabolism, respectively; and ABA-insensitive transcription factor genes *ABI4* (Finkelstein et al., 1998) and *ABI5* (Finkelstein and Lynch, 2000) and zeaxanthine epoxidase gene *ZEP1* (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000) involved in ABA signaling and

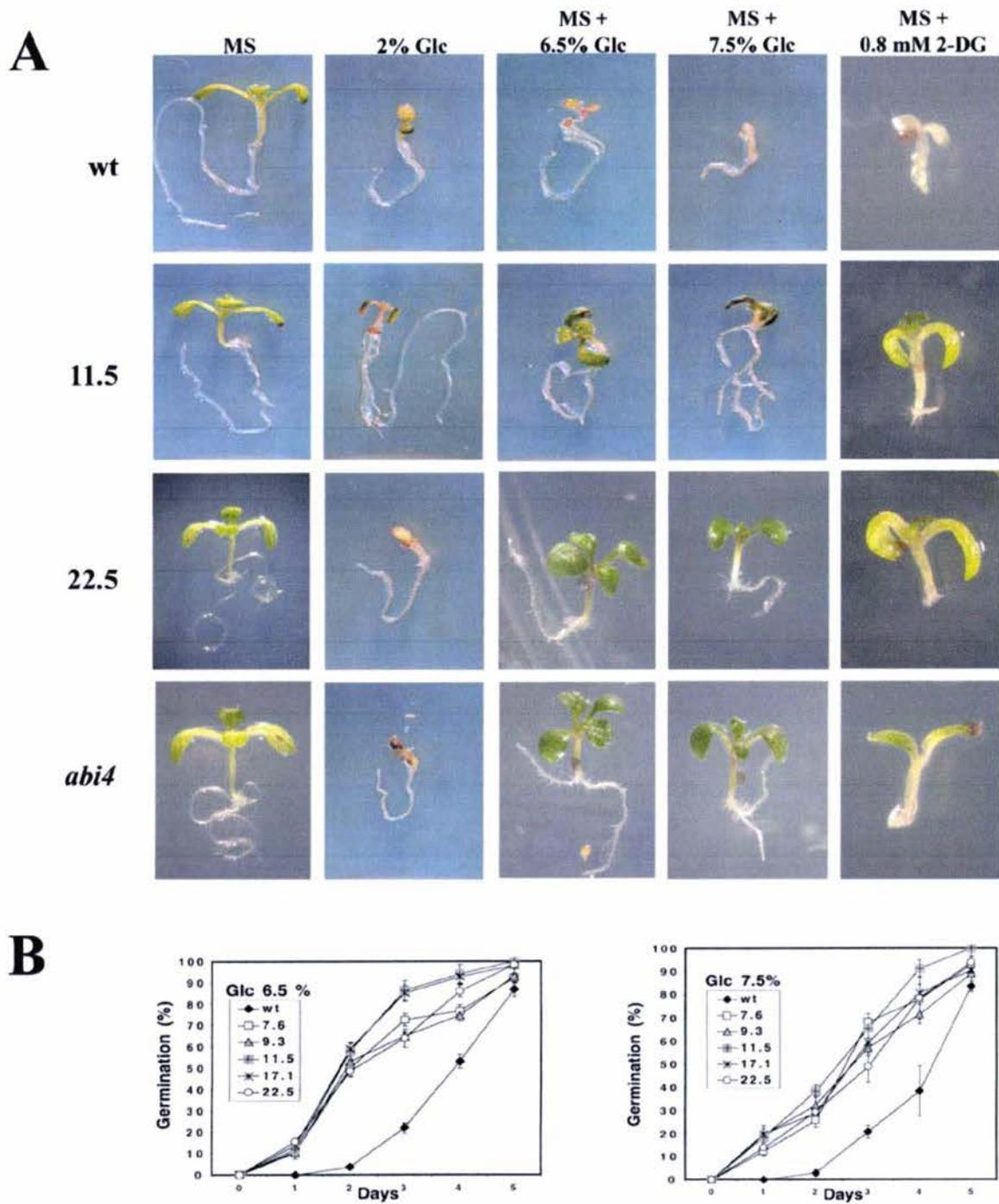


Figure 9. Glc sensitivity of 35S-CpMYB10 plants. A, Transgenic lines overexpressing CpMYB10 gene were germinated on MS salts added with 6.5 or 7.5% Glc, or 2% Glc without MS, or 0.8 mM 2-DG, or MS medium as a control, and growth for 10 d. Representative lines 11.5 and 22.5 are shown in comparison to wild type and *abi4* mutant. B, Germination of 35S-CpMYB10 transgenic lines in MS with 6.5% or 7.5% Glc. Error bar represents sds. The figure represents the average of 3 or more replicates of 100 seeds. Germination was defined as complete protrusion of the radicle.

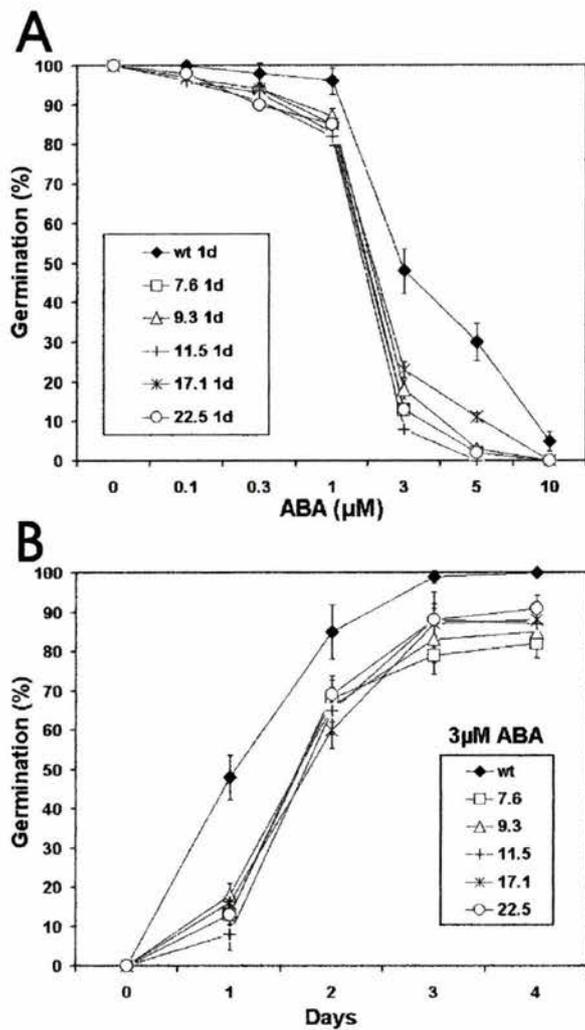


Figure 10. ABA sensitivity of *35S-CpMYB10* plants. A, ABA dose response in germination on MS media supplemented with 0.1, 0.3, 1, 3, 5, or 10 μM ABA. B, Kinetic of germination of the *CpMYB10* transgenic lines on MS containing 3 μM ABA. The data correspond to the average of 3 different experiments each containing 50 seeds per data point. Five independent transgenic (T3 generation) homozygous lines were used in the analysis. Germination was defined as complete protrusion of the radicle.

biosynthesis. Two-week-old wild-type, 11.5, and 22.5 transgenic lines were treated for 16 h with 7.5% Glc, 100 μM ABA, or untreated before RNA-gel blot analysis. It can be observed in Figure 11 that *RD29A*, *COR15a*, and *ADH1* genes are overexpressed in transgenic lines upon ABA treatment, whereas without treatment *RD22*, *COR15a*, and *P5CS1* are repressed in both 11.5 and 22.5 transgenics after comparison to wild-type plants. Under Glc treatment, *RD29A*, *RD22*, *P5CS1*, and *AtMYC2* transcripts were up-regulated only in 11.5 transgenic line. In the case of *ABI4* no differences in gene expression could be observed after comparison with wild-type plants except for a lower

level of induction upon Glc treatment in 11.5 line. Also, the *AtMYB2* gene was partially repressed upon ABA treatment in 11.5 transgenic plants. None of the other analyzed genes (*AtEM6*, *ERD10*, *RD29B*, *SUS1*, *HXK2*, *ABI5*, *ZEP1*, *DREB1A*, and *DREB2A*) were up- or down-regulated under the described conditions in both 11.5 and 22.5 transgenic lines (data not shown).

DISCUSSION

In this work, we analyzed the function of a MYB transcription factor gene, *CpMYB10*, from the resurrection plant *Craterostigma* using different techniques including overexpression in a heterologous back-

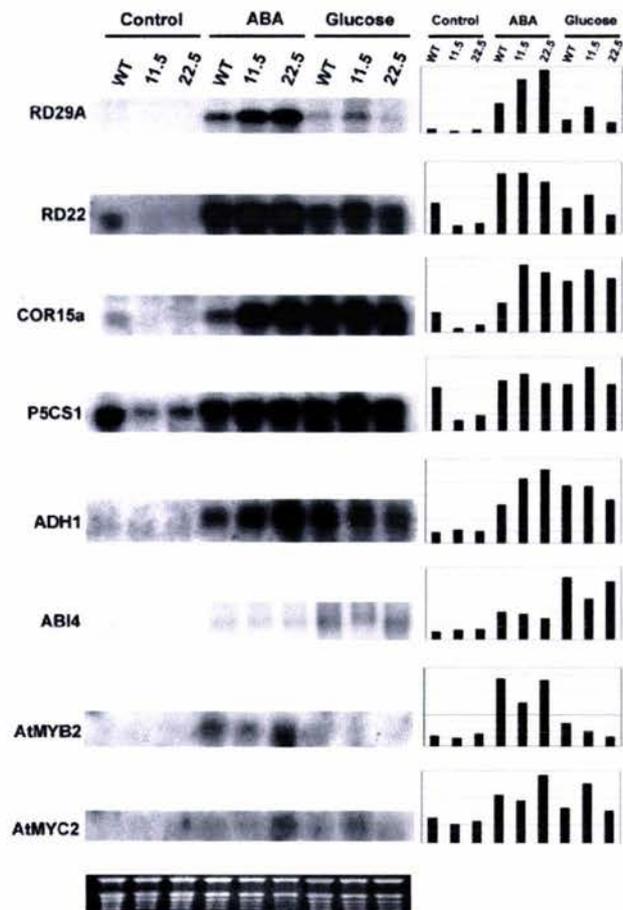


Figure 11. Expression of *CpMYB10* target gene mRNAs in *35S-CpMYB10* plants. RNA gel blotting was conducted to measure the amount of *RD29A*, *RD22*, *COR15A*, *P5CS1*, *ADH1*, *ABI4*, *AtMYB2*, and *AtMYC2* mRNA in transgenic Arabidopsis plants. Each lane was loaded with 10 μg of total RNA from 2-week-old plants grown in normal MS medium and transferred to MS plates containing the indicated compound 16 h before collecting tissue. Graphics show the densitometric quantification of shown bands after normalization against loaded RNA according to Image 1.61 software from NIH. Ethidium bromide-stained rRNAs were used as a loading control (bottom section).

ground. First of all, the expression pattern of the *CpMYB10* gene in *Craterostigma* was addressed by coupled RT and PCR since RNA blot experiments did not detect gene expression, suggesting that *CpMYB10* could be a low-abundance transcript. Here we showed that *CpMYB10* gene is induced by desiccation and ABA treatments in leaves and roots a few minutes after treatment began. In leaves, maximum *CpMYB10* expression was observed around 15 min after desiccation, and thereafter sharply declined. This early induction and rapid shut off suggests a key role of *CpMYB10* in gene activation for stress tolerance. In roots, a biphasic pattern of *CpMYB10* expression was observed, raising the question of whether the same or a different set of genes are transactivated at early (30 min) and late (16 h and thereafter) desiccation stages, which physiologically represent quite different water status levels. ABA turns on *CpMYB10* in leaves and roots also around 15 min after dehydration, maintaining the gene expression for as long as 48 h, the duration of the experiment. Upon dehydration, within the first 30 min, *Craterostigma* leaves have a relative water content of 90% and several genes are already being expressed (Bartels et al., 1990). In contrast, 16 h after dehydration the relative water content drops to only 20% and it goes down to 2.5% in plants desiccated for 48 h (Bartels et al., 1990). After 2 d, *Craterostigma* leaves have lost their chlorophyll, and ultrastructural changes are evident such as convoluted cell walls, shrunk organelles freely suspended in the cytosol, and loss of chloroplast grana (Schneider et al., 1993). Therefore, it is likely that two set of genes for early and late desiccation stages are transactivated by *CpMYB10* in *Craterostigma*.

The expression pattern of *CpMYB10* gene was consistent with its role in stress tolerance. Using in situ coupled RT and PCR analysis in *Craterostigma* tissue sections, *CpMYB10* was found in epidermis, palisade, and spongy parenchyma, and vascular bundle of ABA treated leaves, whereas in ABA treated roots *CpMYB10* expression was limited to the vascular cylinder and some isolated cortex cells. In untreated leaves, *CpMYB10* was faintly expressed in epidermis and in some parenchyma and vascular bundle cells and totally undetectable in roots. Therefore, *CpMYB10* is expressed at basal levels in unstressed leaves and shortly after stress its transcript increases dramatically in a translation-independent manner as mentioned above, suggesting a rapid posttranslational activation mechanism.

The promoter analysis of *CpMYB10* gene in *Arabidopsis* further supported its role in stress tolerance. These experiments showed *GUS* gene induction after dehydration in leaf vascular tissues and conspicuously strong expression in root tip, apical shoot meristem, and emerging leaves. Roots and root cap sense water deficit triggering ABA translocation from roots to shoots (Zhang et al., 1987), thus *CpMYB10* gene might play a major role on this process. Treatment with ABA led to a strong *GUS* staining in all vegetative tissues,

although no staining was visible in root tip. Quantification of *GUS* activity showed that although ABA treatment induced the highest levels of *GUS* at the whole plant level, in roots it was induced 2-fold higher upon dehydration. Also, *CpMYB10* promoter induction by ABA reached its maximum in 6-d-old plants, whereas upon dehydration *GUS* activity peaked in 21-d-old plants. On the other hand, in unstressed plants *GUS* activity was detected at low levels in apical shoot meristem and in pollen grains. Expression of *CpMYB10* promoter in mature pollen grains probably reflects that this tissue is developmentally programmed for desiccation tolerance and hence prone to regulate genes responsive to stress. In addition, since 5' untranslated region leader sequence was present in the construct, posttranscriptional regulatory events cannot be excluded. Other regions, such as intergenic or 3' untranslated region, could be also required for regulation.

The use of protein synthesis inhibitors in transcription analysis in animal and plant cells allowed characterization of genes whose induction is stimulated in the absence of protein synthesis as primary response genes and many of them correspond to transcription factor genes (Herschman, 1991; Fujimoto et al., 2000). Those genes whose induction requires protein synthesis are termed secondary response genes. When unstressed tissues are pretreated with cycloheximide (CHX), *CpMYB10* was highly expressed but not the LEA encoding-gene *Cp11-24*, suggesting that the former gene is independent on prior protein synthesis for its expression. The induction of *CpMYB10* expression in the presence of CHX suggests that translation of a putative repressor protein that could act on its promoter is inhibited, thus releasing *CpMYB10* transcription. Alternatively, it could indicate protection of *CpMYB10* mRNA from degradation by inhibition of labile mRNases. Similar experimental criteria using CHX has been widely used to characterize several plant genes as primary responsive to stimuli (Koshiba et al., 1995; Fujimoto et al., 2000; Bouquin et al., 2001; Laskowski et al., 2002).

A role of *CpMYB10* as a transcription factor was elucidated after analyzing the DNA binding properties of a recombinant *CpMYB10* protein by using EMSA assays. Our results showed that r*CpMYB10* protein has DNA binding recognition for two specific MYB motifs, namely TAACTG and GAACTA sequences present in *CpMYB10* and *Cp11-24* promoter regions, respectively. The TAACTG sequence is also the recognition site of AtMYB2 protein (Urao et al., 1993). Binding of r*CpMYB10* protein to *Cp11-24* promoter element suggests that a possible target gene of *CpMYB10* transcription factor is the *Cp11-24* gene which has been detected 30 min after dehydration of *Craterostigma* leaves (Bartels et al., 1990). The *Cp11-24* gene encodes a LEA (late-embryogenesis abundant) protein which is among other proteins involved in stress tolerance (Ingram and Bartels, 1996). r*CpMYB10* protein also binds to a MYB responsive element

present in its own promoter. The binding of rCpMYB10 to its own promoter could be indicating a possible autoregulation of *CpMYB10* gene. This mechanism has been reported in other plant genes (Schwarz-Sommer et al., 1992; Finkelstein and Lynch, 2000), although it cannot be ruled out that another MYB homolog might regulate *CpMYB10* promoter. Although *CpMYB10* encoded sequence has three potential phosphorylation sites (Iturriaga et al., 1996), apparently no such protein modification is required for DNA binding in vitro.

A major finding of the present study was that overexpression of *CpMYB10* in Arabidopsis using the 35S promoter confers both osmotic stress tolerance of transgenic seedlings germinated in tissue culture and desiccation and salt tolerance in adult plants grown in soil. Other reports have shown that overexpression of transcription factor genes improves stress tolerance. Freezing tolerance was shown in Arabidopsis overexpressing *CBF1* (Jaglo-Ottosen et al., 1998). Plants overexpressing *DREB1A* gene improved their freezing, drought, and salt stress tolerance, although constitutive expression of this gene led to growth retardation, whereas minimal effects were observed when a stress-inducible promoter was used (Kasuga et al., 1999). On the other hand, except for a bulky root system, no other morphological or growth alterations in all transgenic lines overexpressing *CpMYB10* compared to wild-type plants were observed, suggesting that *CpMYB10* may also play an important role in promoting root growth and differentiation. In contrast, overexpression of *AtMYB2* in Arabidopsis showed a dwarf phenotype and no stress tolerance was reported, only coexpression of both *AtMYB2* and *AtMYC2* conferred moderate stress tolerance (measured in an electrolyte leakage test in the presence of mannitol) and plants exhibited severe growth retardation as well (Abe et al., 2003). In contrast, in this study it was found that overexpression of the *CpMYB10* gene alone led to an improved stress tolerance to severe drought and salt conditions in plants.

An important question was to determine which genes are responsible for the stress tolerance phenotype in Arabidopsis overexpressing the *CpMYB10* gene. In an effort to find downstream regulated genes by *CpMYB10* in Arabidopsis, we analyzed the expression pattern of 17 genes involved in either stress tolerance, sugar sensing and metabolism, or ABA signaling and biosynthesis by RNA gel blot. Only 8 of these genes showed altered gene expression in plants overexpressing *CpMYB10*. Two genes encoding hydrophilic proteins, *RD29A* and *Cor15A*, and the alcohol dehydrogenase *ADH1* gene were up-regulated in 35S-*CpMYB10* plants upon ABA treatment. Overexpression of *DREB1A* or *CBF1* transcription factor genes in Arabidopsis led to up-regulation of several hydrophilic protein genes including *RD29A* and *COR15a* (Jaglo-Ottosen et al., 1998; Kasuga et al., 1999). In contrast, the overexpression of *AtMYB2* in Arabidopsis only activates *ADH1*, although coexpression of

both *AtMYB2* and *AtMYC2* up-regulates several other genes, including *RD22*, *COR6.6*, and *SUS1* (Abe et al., 2003). We also found that *RD22*, *Cor15a*, and *P5CS1* are down-regulated in 35S-*CpMYB10* plants without stress but not under ABA or Glc treatments, suggesting that *CpMYB10* might be acting on these genes as a repressor and activator. A transcriptomics profile would reveal other target genes of *CpMYB10* in Arabidopsis. Noteworthy is the presence of multiple plant *myb* binding sites in the 1-kb upstream sequence of the putative promoter region of all the putative target genes analyzed in this study, as revealed by PLACE computer analysis program (Higo and Ugawa, 1999), supporting a possible transactivation by *CpMYB10* upon them.

Taking together these results with the EMSA analysis, it is tempting to speculate whether this dual role is also present in *Craterostigma*, *CpMYB10* acting as a repressor in unstressed tissues and as an activator upon dehydration. For instance, it could be involved in maintaining *CpMYB10* gene shut off in unstressed conditions, and could also activate *Cp11-24* and other target genes upon dehydration. This dual mechanism could allow a fast down-regulation of target genes responsive to abiotic stress. This shift in activity could well be modulated by a kinase or phosphatase in order to rapidly activate gene response for adapting cells to abiotic stress.

Besides having an essential function in plant metabolism, sugars play a role in regulating developmental and physiological processes such as photosynthesis, photomorphogenesis, flowering, and germination (Smeekens, 2000). The isolation of Arabidopsis mutants exhibiting normal development and greening when germinated on high Glc concentrations has been reported. The molecular identity of some mutants with a similar phenotype corresponded to the *ABI4* and *ABI5* transcription factors required for ABA signaling, suggesting a link between sugar- and ABA-signaling pathways (Arenas-Huertero et al., 2000; Finkelstein and Lynch, 2000). The molecular mechanisms by which *abi4* and *abi5* mutants affect sugar and stress responses are currently unknown. In this work it was found that overexpression of *CpMYB10* gene in Arabidopsis conferred insensitivity to high Glc concentrations and also ABA hypersensitive response. To correlate these phenotypes with a possible altered expression pattern of well-characterized genes involved in Glc and ABA responses, the transcription of *ABI4*, *ABI5*, and *HXX2* genes was analyzed. *ABI5* and *HXX2* transcription pattern was not modified; only *ABI4* was partially repressed in 11.5 line but not in 22.5 under Glc treatment. Overexpression of *AtMYB2* also conferred ABA hypersensitive response but no Glc response was reported (Abe et al., 2003).

The use of 2-DG analog allows us to suggest that these transgenic lines are affected at least in part in the hexose phosphorylation-dependent sugar signaling, commonly interpreted as the HXK-dependent pathway. These data correlate with the *abi4* phenotype

observed in presence of this Glc analog, which has been demonstrated to participate in the HXK-dependent sugar signaling (Pego et al., 1999). In fact, *sun6* mutant, an *abi4* allele, was shown to be less sensitive to photosynthesis inhibition by 2-DG than wild-type plants in adult stages (Van Oosten et al., 1997), further supporting our observations at earlier developmental stages. However, interpretations based on the use of Glc analogs must be taken carefully as no specific studies about their metabolism and effects on different tissues and plant species have been performed (Gibson, 2000). A direct link between the sugar response and stress resistance of the transgenic lines expressing *CpMYB10* is still difficult to establish. Data about the molecular bases for both phenotypes in these transgenics remains to be determined in the future. However, osmotolerant phenotypes on sugar response mutants have been reported (Gibson, 2000), which correlates with our results.

In summary, in this study it is shown that a *MYB* homolog (*CpMYB10*) from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* is induced by dehydration and ABA treatments in leaves and roots and in transgenic Arabidopsis as well. The expression of *CpMYB10* is induced early and could be activated by CHX treatment alone, suggesting its regulation by unknown and short-lived repressor or RNase. *CpMYB10* might regulate its own promoter and transactivate the LEA *Cp11-24* gene. We propose that this *MYB* gene might account in part for the differences between *Craterostigma* and Arabidopsis regarding drought tolerance. This is substantiated by the ectopic expression of *CpMYB10* in Arabidopsis that confers salt and drought tolerance and led to an altered expression of several stress-responsive genes. Additionally, overexpression of *CpMYB10* in Arabidopsis led to ABA hypersensitive and Glc insensitive phenotypes by an unknown mechanism. This is the first report of a transgenic plant with improved stress tolerance using a gene from a resurrection plant. Additionally, heterologous expression of *CpMYB10* transcription factor gene represents a potential approach to improve stress tolerance in crops avoiding endogenous mechanisms that often cosuppress the transgene of interest.

MATERIALS AND METHODS

Plant Growth Conditions and Stress Treatments

Craterostigma plantagineum Hochst. and Arabidopsis ecotype Columbia (wild type or transgenic) were grown at 24°C/20°C with 16 h light/8 h dark cycle on sterile MS medium supplemented with 2.0% and 1.0% Suc, respectively, and solidified with 0.8% phytoagar. The carbon source was as mentioned, unless another is indicated. To break dormancy, seeds were incubated at 4°C for 4 d before germination. Fully grown *Craterostigma* plants (before flowering) were used to perform dehydration and ABA treatments. For *Craterostigma* dehydration experiments the plants were placed on filter paper in a growth chamber under described conditions. For ABA treatment, *Craterostigma* plants were submerged in a solution containing 100 μ M ABA (Sigma-Aldrich, St. Louis). For dehydration treatment of Arabidopsis, 4-week-old plants grown on a 1:1:1 mixture of vermiculite, perlite, and peat moss were used. At week 5, watering was stopped for 2 weeks and then rewatered, and

allowed to grow one more week before being photographed. For salt stress treatment in pots, 4-week-old Arabidopsis plants were watered every 4 d with increasing concentrations of NaCl, starting from 50 mM, 100 mM, 150 mM, and 200 mM, and twice with 250 mM. For salt, sugar, ABA, and osmotic stress treatments performed in plates, the wild-type and transgenic Arabidopsis seeds were germinated in MS media containing the indicated salt, Glc, 2-DG analog, or osmotic agent concentration. For treatments in GUS experiments, 3-week-old plants were transferred from standard MS medium to plates containing the indicated compounds.

RT-PCR Expression Analysis

RT-PCR experiments were performed using 5 μ g of total RNA extracted from *Craterostigma* by standard procedures and used for first strand cDNA synthesis with SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen, Gaithersburg, MD) and oligo(dT). PCR program consisted of 25 to 40 cycles of amplification (1 min, 95°C; 30 s, 52°C; and 2 min, 72°C) using Taq polymerase (Roche Diagnostics, Indianapolis) and sequence-specific primers for each gene. The specific oligonucleotides designed to amplify the cDNA corresponding to *CpMYB10* have the following sequence: primer *CpMYB10*-sense 5'-AGGCATCAGCTTTTCTT-3', and *CpMYB10*-antisense 5'-ATGGTACGTCCTTGATT-3'. The expected 1.1-kb PCR product was cloned and sequenced, and corresponded to the *CpMYB10* cDNA after comparison with the corresponding genomic clone (Iturriaga et al., 1996). Specific oligonucleotides to amplify *Cp11-24* (forward 5'-GAAGTTCGATGCTAACGA-3', reverse 5'-TGCTCATCCGACGACGAGC-3') and *Cp1t3* (forward 5'-TGGATGGGAAAAGCTC-3', reverse 5'-AAACAACCCCTCACTCCC-3') gene transcripts of *Craterostigma* yielded 629- and 733-bp fragments, respectively. Each RT-PCR result was confirmed in three biologically independent experiments. Aliquots at different cycles of PCR reactions were analyzed to select for the linearity phase of the exponential PCR reaction. RT-PCR products were resolved in 1 \times Tris-acetate EDTA, 1% agarose gels stained with ethidium bromide. The figures present the negatives of the fluorescent images.

Purification of Recombinant CpMYB10 Protein

To express a hexahistidine-CpMYB10 fusion protein in bacteria, the *CpMYB10* cDNA was amplified by PCR using *Bgl*III-CPM10.5 (5'-GAAGATCTATGAACCAACAGCAGGTTA-3') and CPM10.3-*Kpn*I (5'-GGGGTACCTTCGTATATCTAAAAGCAGC-3') primers and cloned in the pQE30 vector (Quiagen, Valencia, CA) on *Bam*HI and *Kpn*I restriction sites. DNA fusion was sequenced to confirm the in-frame cloning and used to transform BL21 *Escherichia coli* strain. Protein expression was achieved by adding 1 mM isopropylthio- β -galactoside to bacterial cultures and let grown for 2 h at 37°C. The soluble protein was purified according to manufacturer's instructions by affinity chromatography in Ni-NTA resin (Quiagen) and concentrated by Centricon-10 centrifugal concentrators (Amicon, Billerica, MA), before diluting in 3 mL of binding buffer (15 mM HEPES, 8 mM Tris, 120 mM KCl, 0.14 mM EDTA, 7 mM β -ME, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 10% glycerol). The protein concentration was determined with Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) and checked by SDS-PAGE.

EMSA

The EMSA protocol was essentially as previously described by Armstrong et al. (1992). The double-strand complementary oligonucleotides used as probes were radioactive labeled using α -³²P dATP and α -³²P dCTP and Klenow enzyme (Roche Diagnostics), and diluted to 1 ng/ μ L containing at least 50,000 cpm. For each reaction, around 100 ng of pure recombinant protein was used, 1.0 μ g of salmon sperm DNA, and 1 μ L milk powder suspension (20 mg/mL low fat milk powder). The reaction mixture was loaded on a native polyacrylamide gel (4% acrylamide, 0.1% N,N'-methylenebisacrylamide, 0.2 \times Tris-acetate EDTA, 7% glycerol, 0.06% ammonium persulfate, and 0.06% N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine). The gel was prerun at 100 V for 1 h at room temperature and run at 150 V for 3 to 4 h at 4°C. After electrophoresis, the gel was dried and exposed to x-ray film. The primer sequences used were: MYB-P10 forward 5'-GTGATATAGTTAACTGAAACTGC-3', MYB-P10 reverse 5'-GIGTGCAGTTTCAGTTAACTATAT-3', MYB-P10-mut forward 5'-GTGATATAGTTCCCTGAAACTGC-3', MYB-P10-mut reverse 5'-GTGIGCAGTTTCAGGGAACATAT-3', MYB11-24 forward 5'-GTGTACAGAGGTGAACTACCGAATC-3', MYB11-24 reverse 5'-GTGTGATTGGTAGTTCACCTCTGT-3', MYB11-24-mut forward 5'-GTGTACA-

GAGGTGCCCTACGAATC-3', MYB11-24-mut reverse 5'-GTGTGATTCCG-TAGGGCACCTCTGT-3'.

RT-PCR in Situ

Transversal leaf or root hand-cut sections (100–200 μm) of *Craterostigma* plants pretreated with 100 μM ABA for 1 h were tested for RT-PCR in situ technique (Xoconostle-Cázares et al., 1999) using Oregon Green 488-5-dUTP as fluorescent label (Molecular Probes, Eugene, OR) and GeneAmp EZ rTth RNA PCR kit (Perkin Elmer, San Jose, CA). The primers used in the amplification were the same as described before for *CpMYB10* cDNA in the expression analysis section. The fluorescent signal was visualized in a confocal laser scanning microscope.

Plant Transformation

Two binary vector constructs were used to transform *Arabidopsis*. For the overexpression of *CpMYB10*, its 1.1-kb cDNA was amplified by RT-PCR with primers *CpMYB10*-sense and *CpMYB10*-antisense, cloned in pBluescript SK⁻ (Stratagene, La Jolla, CA) and the DNA sequence was determined before subcloning in pBin19 vector (Bevan, 1984) containing the 0.8-kb 35S-promoter and 0.3-kb NOS polyadenylation site. This construct was introduced by electroporation in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 strain containing the pGV2260 plasmid. The second construct consisted of the 1.5 kb *CpMYB10* promoter region (P10) fused to the *uidA* (*GUS*) gene (Jefferson, 1987). The promoter fragment was amplified by PCR using Expand High Fidelity PCR System (Roche) using as a template the genomic CPM10 clone (Iturriaga et al., 1996), and primers MVP.5 (5'-CGGGTACCTATATGCTAGGATAGGAT-AC-3') and MVP.3 (5'-CGAATTCATGTCTGTATTTCTCTCTCC-3'), cloned in pBluescript SK⁺ and sequenced. A translational fusion between the first putative ATG of *CpMYB10* and the first codon of *GUS* gene was created before subcloning in pBin19 vector. This construct was introduced by electroporation in *A. tumefaciens* C58C1 strain. The resulting bacteria were used to transform wild-type *Arabidopsis* (Col) by in planta vacuum infiltration (Bechtold et al., 1993). Seedlings were grown on MS medium supplemented with 1% Suc and for selection of transgenic plants 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ kanamycin (Sigma-Aldrich) was added to the medium. One-week-old plantlets were transferred to pots under described conditions until plants formed seeds. To select homozygous lines, T2 generation seeds were analyzed for germination on kanamycin. Only T3 plants with a 3:1 segregation ratio were used. Ten independent homozygous lines for 35S-*CpMYB10* and three for P10-*GUS* construct were isolated.

Distribution of Materials

Upon request, all novel materials described in this publication will be made available in a timely manner for noncommercial research purposes, subject to the requisite permission from any third-party owners of all or parts of the material. Obtaining any permissions will be the responsibility of the requestor.

GUS Histochemical and Fluorimetric Assays

The histochemical staining of GUS activity in transgenic plants was performed as described by Jefferson et al. (1987). Seedlings were fixed in a 0.3 (w/v) formaldehyde solution containing 10 mM MES, pH 7.5, and 0.3 M mannitol for 30 min on ice prior to staining. Stained samples were rinsed extensively in 70% ethanol to remove chlorophyll. The stained plants were analyzed using a bright-field microscopy (Type 104, Nikon, Tokyo). Crude plant extracts for fluorimetric assay of GUS enzyme activity were prepared with an extraction buffer consisting of 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.0, 10 mM EDTA, 0.1% (w/v) Triton X-100, 0.1% (w/v) sodium lauryl sarcosine, and 10 mM β -mercaptoethanol. GUS activity was assayed as described by Jefferson et al. (1987) with 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (Sigma-Aldrich) as a substrate.

Gel Blot Analysis

Total RNA was isolated (Ausubel et al., 1989) from seedlings grown as indicated using standard protocols. For northern blots, total RNA was fractionated by electrophoresis in 1.2% (w/v) agarose gels and transferred onto Hybond N+ nylon membrane (Amersham, Buckinghamshire, UK).

Hybridizations and washes were performed at high stringency conditions according to standard procedures, using ³²P-radiolabeled probes. Probes for all the used genes were obtained by PCR using specific primers and cDNAs prepared from ABA-treated *Arabidopsis* plants. The graphic representation of densitometric quantification of the northern experiments were done using the public domain NIH Image program (developed at the United States National Institutes of Health and available on the Internet at <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>) and normalized in each case by the amount of rRNA in the gel.

Sequence data from this article have been deposited with the EMBL/GenBank data libraries under accession number AF510112 for the *CpMYB10* cDNA.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs. Analia Arroyo for critical reading of the manuscript, Juan Estevez for his technical advice on *Arabidopsis* transformation, and Beatriz Xoconostle-Cázares and Roberto Ruiz-Medrano for training on RT-PCR in situ technique. We also thank Xochitl Alvarado for assistance on confocal laser scanning microscope and Paul Gaytán and Eugenio López for oligonucleotide synthesis.

Received September 30, 2003; returned for revision January 16, 2004; accepted February 6, 2004.

LITERATURE CITED

- Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, Iwasaki T, Shinozaki K (1997) Role of MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9: 1859–1868
- Abe H, Urao T, Ito T, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2003) *Arabidopsis* AtMYC (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 63–78
- Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815
- Arenas-Huertero F, Arroyo A, Zhou L, Sheen J, León P (2000) Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes Dev* 14: 2085–2096
- Armstrong GA, Weisshaar B, Hahlbrock K (1992) Homodimeric and heterodimeric leucine zipper proteins and nuclear factors from parsley recognize diverse promoter elements with ACGT cores. *Plant Cell* 4: 525–537
- Ausubel FM, Brent R, Kingstone RE, Moore DD, Siedman JG, Smith JA, Struhl K (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York
- Baker SS, Wilhelm KS, Tomashow MF (1994) The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Mol Biol* 24: 701–713
- Bartels D, Schneider K, Terstappen G, Piatkowski D, Salamini F (1990) Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Planta* 181: 27–34
- Bartels D, Salamini F (2001) Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Plant Physiol* 127: 1346–1353
- Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993) *In planta* Agrobacterium mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci Paris* 316: 1194–1199
- Bernacchia G, Schwall G, Lottspeich F, Salamini F, Bartels D (1995) The transketolase gene family of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*: differential expression during the rehydration phase. *EMBO J* 14: 610–618
- Bevan M (1984) Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res* 12: 8711–8721
- Bockel C, Salamini F, Bartels D (1998) Isolation and characterization of genes expressed during early events of the dehydration process in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *J Plant Physiol* 152: 158–166
- Bouquin T, Meier C, Foster R, Nielsen ME, Mundy J (2001) Control of

- specific gene expression by gibberellin and brassinosteroid. *Plant Physiol* 127: 450–458
- Choi H, Hong J, Ha J, Kang J, Kim SY (2000) ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *J Biol Chem* 275: 1723–1730
- Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM (1998) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 60: 73–103
- de Bruxelles GL, Peacock WJ, Dennis ES, Dolferus R (1996) Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 111: 381–391
- DeWald DB, Torabinejad J, Jones CA, Shope JC, Cangelosi AR, Thompson JE, Prestwich GD, Hamma H (2001) Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-triphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 126: 759–769
- Finkelstein RR, Wang ML, Lynch TJ, Rao S, Goodman HM (1998) The *Arabidopsis* abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell* 10: 1043–1054
- Finkelstein RR, Lynch TJ (2000) The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12: 599–609
- Frank W, Phillips J, Salamini F, Bartels D (1998) Two dehydration-inducible transcripts from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* encode interacting homeodomain-leucine zipper proteins. *Plant J* 15: 413–421
- Frank W, Munnik T, Kerkmann K, Salamini F, Bartels D (2000) Water deficit triggers phospholipase D activity in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell* 12: 111–123
- Fujimoto SY, Ohta M, Usui A, Shinshi H, Ohme-Takagi M (2000) Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* 12: 393–404
- Gaff DF (1971) Desiccation-tolerant flowering plants in Southern Africa. *Science* 174: 1033–1034
- Gibson SI (2000) Plant sugar-response pathways. Part of a complex regulatory web. *Plant Physiol* 124: 1532–1539
- Herschman HR (1991) Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu Rev Biochem* 60: 281–319
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* 27: 297–300
- Hoekstra FA, Golovina EA, Buitink J (2001) Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci* 6: 431–438
- Huijser C, Kortstee A, Pego J, Weisbeek P, Wisman E, Smeekens S (2000) The *Arabidopsis* *SUCROSE UNCOUPLED-6* gene is identical to *ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4*: involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant J* 23: 577–585
- Ingram J, Bartels D (1996) The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 47: 377–403
- Iturriaga G, Leyns L, Villegas A, Gharibeh R, Salamini F, Bartels D (1996) A family of novel *myb*-related genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* are specifically expressed in callus and roots in response to ABA or desiccation. *Plant Mol Biol* 32: 707–716
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF (1998) *Arabidopsis* *CBF1* overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104–106
- Jang J-C, Sheen J (1994) Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell* 6: 1665–1679
- Jang J-C, Leon P, Zhou L, Sheen J (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell* 9: 5–19
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep* 5: 387–405
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901–3907
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol* 17: 287–291
- Kiyosue T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) Characterization of two cDNAs (ERD10 and ERD14) corresponding to genes that respond rapidly to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 35: 225–231
- Knight H, Knight MR (2001) Abiotic stress signalling pathways: specificity and cross-talk. *Trends Plant Sci* 6: 262–267
- Koshiba T, Ballas N, Wong LM, Theologis A (1995) Transcriptional regulation of *PS-IAA4/5* and *PS-IAA6* early gene expression by indoleacetic acid and protein synthesis inhibitors in pea (*Pisum sativum*). *J Mol Biol* 253: 396–413
- Laby RJ, Kincaid S, Kim D, Gibson S (2000) The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant J* 23: 587–596
- Laskowski M, Dreher KA, Gehring MA, Abel S, Gensler AL, Sussex IM (2002) FQRL, a novel primary auxin-response gene, encodes a flavin mononucleotide-binding quinone reductase. *Plant Physiol* 128: 578–590
- Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y, Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1998) Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391–1406
- Martin T, Frommer WB, Salanoubat M, Willmitzer L (1993) Expression of an *Arabidopsis* sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs. *Plant J* 4: 367–377
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W-A, Liu Y-X, Hwang I, Jones T, Sheen J (2003) Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science* 300: 332–336
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15: 473–497
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hancock JT (2002) Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol* 128: 13–16
- Pego JV, Weisbeek PJ, Smeekens SCM (1999) Mannose inhibits Arabidopsis germination via a hexokinase-mediated step. *Plant Physiol* 119: 1017–1023
- Quesada V, Ponce MR, Micol JL (2000) Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 154: 421–436
- Schneider K, Wells B, Schmelzer E, Salamini F, Bartels D (1993) Desiccation leads to the rapid accumulation of both cytosolic and chloroplastic proteins in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta* 189: 120–131
- Schwarz-Sommer Z, Hue I, Huijser P, Flor PJ, Hansen R, Tetens F, Lönning WE, Saedler H, Sommer H (1992) Characterization of the *Antirrhinum* floral homeotic MADS-box gene *deficiens*: evidence for DNA binding and autoregulation of its persistent expression throughout flower development. *EMBO J* 11: 251–263
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 3: 217–223
- Smeekens S (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 49–81
- Stockinger EJ, Gilmour SJ, Thomashow MF (1997) *Arabidopsis thaliana* *CBF1* encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1035–1040
- Stracke R, Werber M, Weisshaar B (2001) The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* 4: 447–456
- Tabaeizadeh Z (1998) Drought-induced responses in plant cells. *Int Rev Cytol* 182: 193–246
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K (1993) An *Arabidopsis* *myb* homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell* 5: 1529–1539
- Urao T, Yakubov B, Satoh R, Yamaguchi-Shinozaki K, Seki M, Hirayama T, Shinozaki K (1999) A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* 11: 1743–1754
- Van Oosten JJM, Gerbaut A, Huijser C, Dijkwel PP, Chua N-H, Smeekens SCM (1997) An Arabidopsis mutant showing reduced feedback inhibition of photosynthesis. *Plant J* 12: 1011–1020
- Velasco R, Salamini F, Bartels D (1998) Gene structure and expression analysis of the drought- and abscisic acid-responsive CDeT11-24 gene family from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta* 204: 459–471

- Vicient CM, Hull G, Guillemot J, Devic M, Delseny M (2000) Differential expression of the *Arabidopsis* genes coding for Em-like proteins. *J Exp Bot* **51**: 1211–1220
- Xoconostle-Cázares B, Xiang Y, Ruiz-Medrano R, Wang HL, Yoo BC, McFarland KC, Franceschi VR, Lucas WJ (1999) Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* **283**: 94–98
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1993) The plant hormone abscisic acid mediates the drought-induced expression but not the seed-specific expression of *rd22*, a gene responsive to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Gen Genet* **238**: 17–25
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994) A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* **6**: 251–264
- Yoshida Y, Nanjo T, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Stress-responsive and developmental regulation of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase 1 (P5CS1) gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun* **261**: 766–772
- Zhang J, Schurr U, Davies WJ (1987) Control of stomatal behaviour by abscisic acid which apparently originates in roots. *J Exp Bot* **38**: 1174–1181

V.2 RESULTADOS ADICIONALES

V.2.1 Análisis de la expresión de los genes *CpMYB5* y *CpMYB7*.

De manera semejante a *CpMYB10*, para analizar la expresión de *CpMYB5* y *CpMYB7* se utilizó la técnica de RT-PCR. Para ello, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos, los cuales se aparean en las regiones UTR5' y 3' correspondientes. La especificidad de los iniciadores fue confirmada en reacciones de PCR independientes, utilizando como templado DNA de las clonas genómicas para *CpMYB5* y *CpMYB10*, y una clona de cDNA correspondiente a *CpMYB7*. Para el diseño de estos oligos se tomaron en cuenta una serie de consideraciones: temperaturas de alineamiento semejantes (55 – 60° C), que amplificaran completamente las regiones codificantes, que no formaran estructuras secundarias ni sitios falsos de alineamiento. En la Figura 9, se observa la confirmación de la especificidad de la amplificación de los oligos diseñados.

Con el objetivo de determinar la respuesta de *CpMYB5* a estrés tanto en las hojas como en las raíces, se realizaron RT-PCRs utilizando plantas de *Craterostigma* tratadas con ABA o sequía a diferentes tiempos. Para la síntesis de los cDNAs se utilizaron las mismas condiciones reportadas para el análisis de *CpMYB10* (Villalobos *et al.*, 2004). En este análisis se observó que las respuestas que presenta el gen *CpMYB5* ante sequía y ABA son distintas a las de *CpMYB10* (Fig.10). Al menos dentro de los tiempos que fueron analizados, no se detectó el transcrito de *CpMYB5* en hojas deshidratadas. A semejanza de la respuesta de *CpMYB10*, en raíces deshidratadas también se observó una respuesta bifásica de *CpMYB5*, ya que el transcrito se detecta a los 30 min y desaparece desde 1-3 h del tratamiento, para volverse a detectar a las 16 h (Fig. 10). Por lo que respecta a los tratamientos con ABA, en las hojas se detectó la acumulación de *CpMYB5* desde los 15 min, pero esta desapareció después de 1 h de tratamiento. En las raíces tratadas con ABA, se detectó una débil expresión basal de *CpMYB5* en el control (raíces expuestas a agua durante 48 hrs). Sin embargo, desde los 15 min se puede observar un aumento en la acumulación del transcrito de *CpMYB5*, y estos niveles suben y bajan a lo largo de la cinética (Fig. 10), mostrando un comportamiento bifásico.

El análisis de expresión de *CpMYB7* también fue conducido bajo las mismas condiciones. Sin embargo, en los tratamientos y tejidos analizados, no se detectó la acumulación del transcrito de este gen en los tiempos monitoreados (Fig. 11).

Por otro lado, también se realizaron experimentos de RT-PCR *in situ* con el fin de determinar en que tipos celulares se expresa *CpMYB5* (Fig. 12). Se observó una acumulación drástica del transcrito de este gen, pero a diferencia con *CpMYB10*, en hojas tratadas con ABA la expresión de *CpMYB5* se restringe a las células del parénquima. Aparentemente no existe expresión de *CpMYB5* en la epidermis de las hojas de *Craterostigma*. En las hojas control, se detectó una señal muy débil de *CpMYB5* en células aisladas del parénquima. En los cortes de raíces control, se observó una señal muy débil que se restringe a los haces vasculares, pero esta señal se incrementa drásticamente en las células del córtex cuando las raíces son tratadas con ABA. Especialmente el patrón de expresión de *CpMYB5* y *CpMYB10* en las raíces, indica que ambos genes responden a ABA pero en distintos tipos celulares.

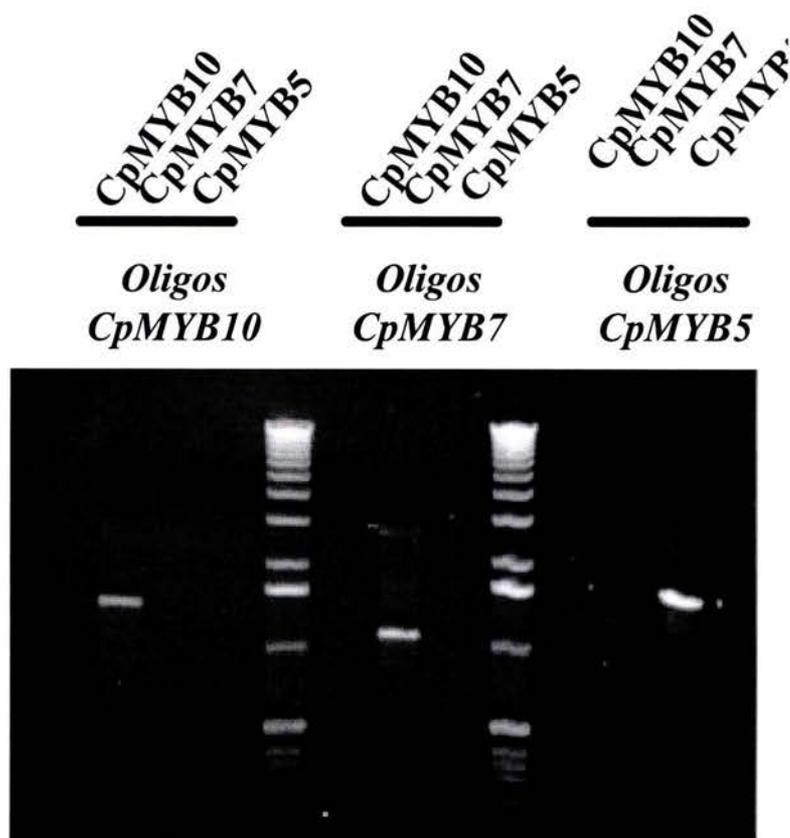


Fig. 9. PCRs que muestran la especificidad de los oligos diseñados para amplificar *CpMYB5*, *CpMYB7* y *CpMYB10*. Las reacciones fueron realizadas utilizando 10 ng de DNA templado y 0.1 μ M de cada oligo, bajo las siguientes condiciones: 94° C, 30 seg.; 94° C 30 seg, 52-55° C 30 seg, 72° C 2 min por 35 ciclos; 72° C 10 min. Los DNAs utilizados como templados se obtuvieron a partir de las clonas genómicas de *CpMYB5* y *CpMYB10*, y de la clona de cDNA de *CpMYB7* previamente reportadas (Iturriaga *et al.*, 1996). Los iniciadores específicos para *CpMYB10* son los mismos previamente reportados (Villalobos *et al.*, 2004). Los iniciadores para *CpMYB5* son los siguientes: Cpm5 sense: 5'-AGCATCAGCTTTTTTGTC-3', y Cpm5 antisense: 5'-AACGTACGTCCTTGAATG-3'. Los oligos diseñados para *CpMYB7* fueron: Cpm7 sense 5'-TAAGTGCTCTCATCAATC-3', y Cpm7 antisense: 5'-AATTTGAATGTGGCTTCC-3'.

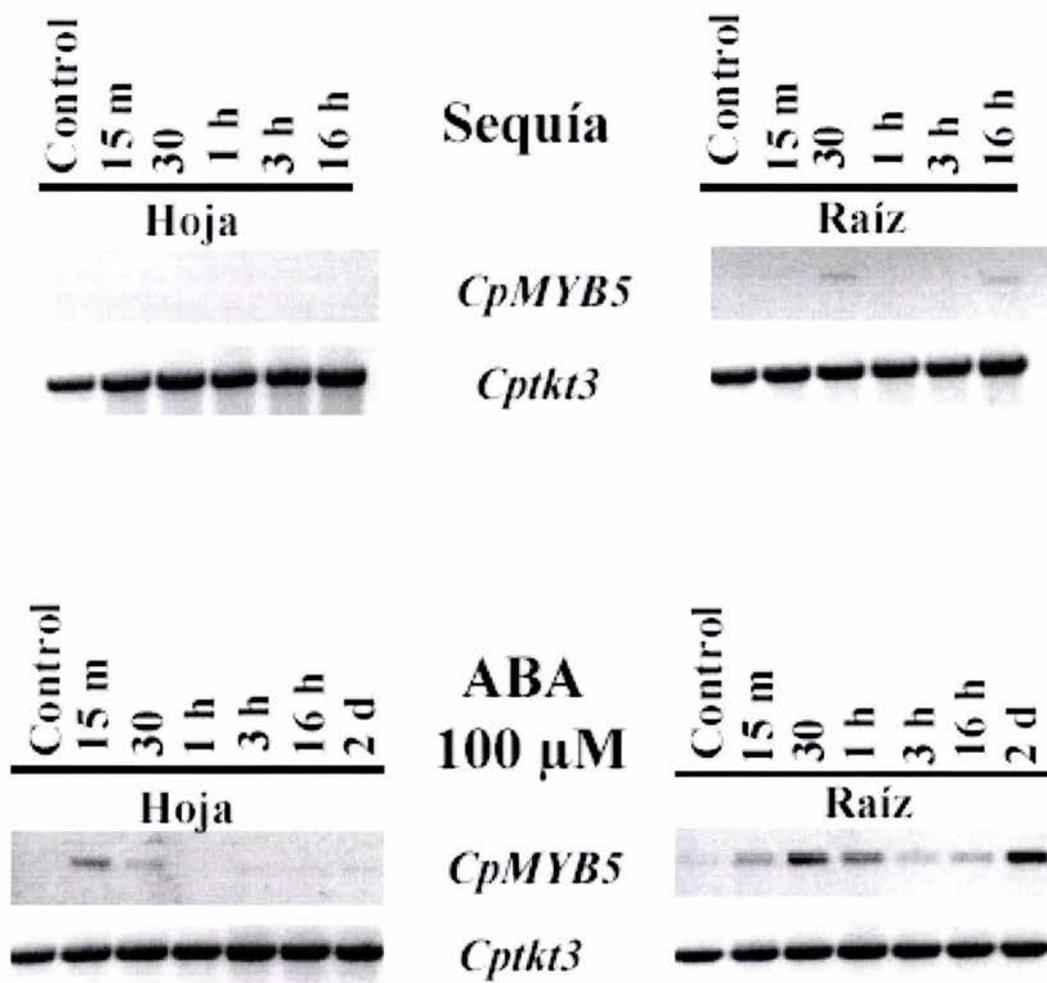


Fig. 10. Respuestas de *CpMYB5* a tratamientos de sequía y ABA. Las condiciones utilizadas para este análisis de expresión fueron las mismas reportadas para *CpMYB10* (Villalobos *et al.*, 2004). Los iniciadores para *CpMYB5* son los siguientes: Cpm5 sense: 5'-AGCATCAGCTTTTTTGTC-3', y Cpm5 antisense: 5'-AACGTACGTCCTTGAATG-3'.

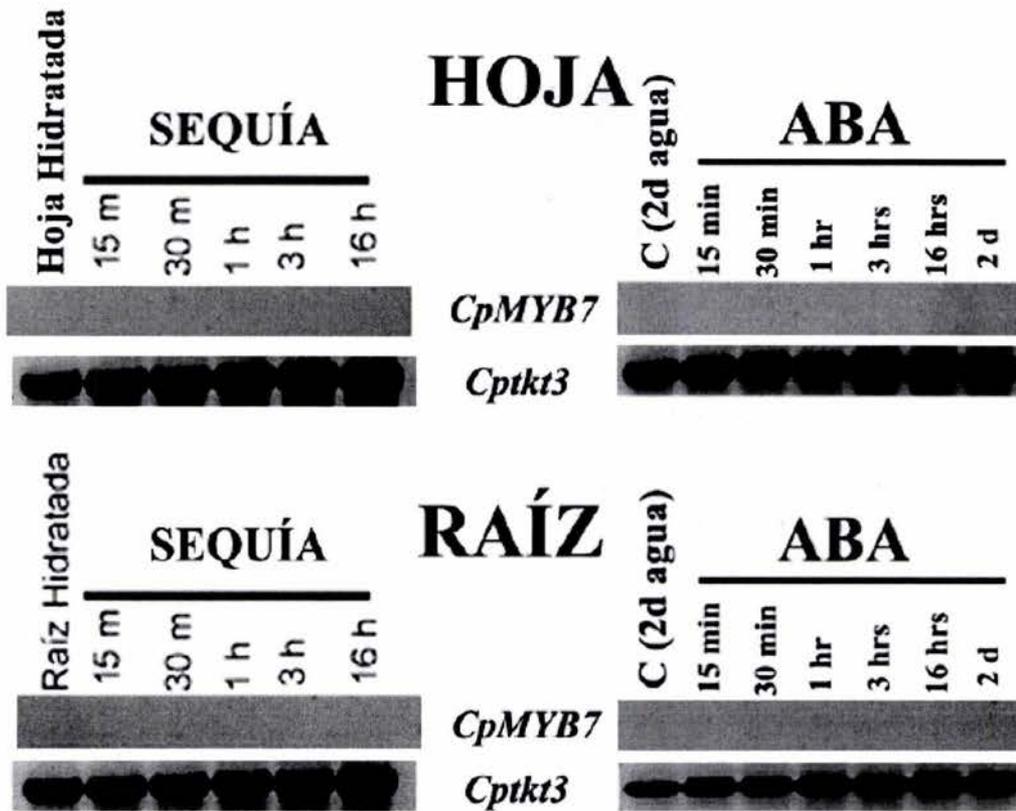


Fig. 11. *CpMYB7* no responde a tratamientos de sequía y ABA bajo las condiciones analizadas. Las condiciones utilizadas para este análisis de expresión fueron las mismas reportadas para *CpMYB10* (Villalobos *et al.*, 2004). Los oligos diseñados para *CpMYB7* fueron: Cpm7 sense 5'-TAAGTGCTCTCATCAATC-3', y Cpm7 antisense: 5'-AATTTGAATGTGGCTTCC-3'.

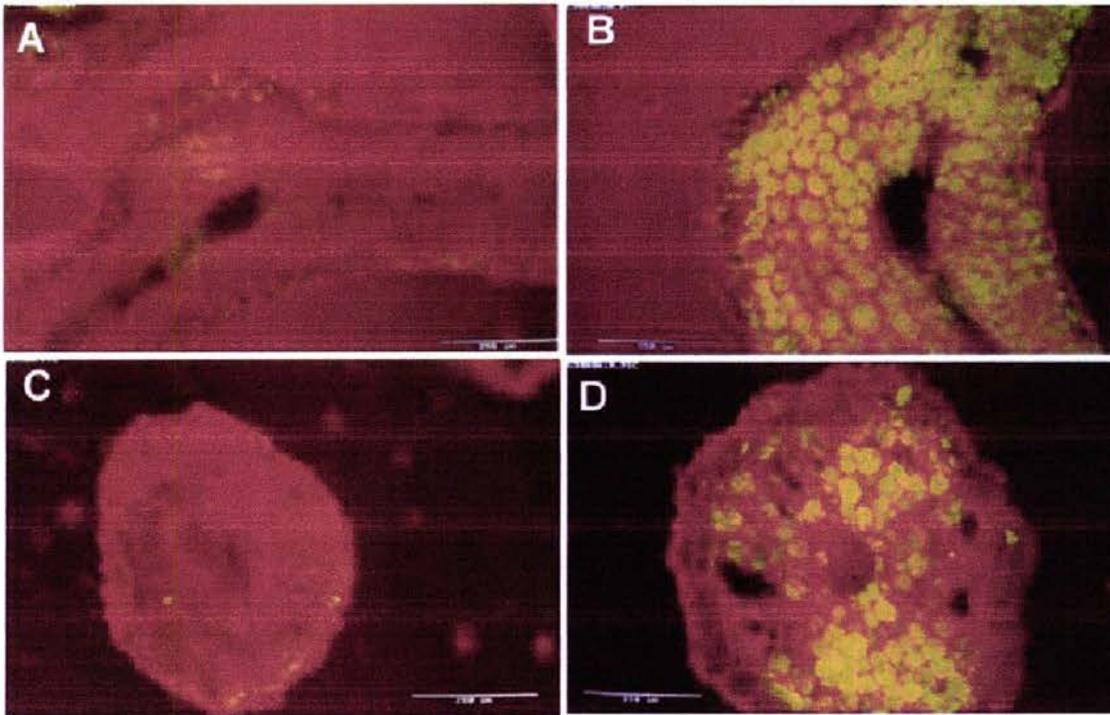


Fig. 12. Localización de la expresión de CpMYB5 en tejidos de *Craterostigma* tratados con ABA. A, imágenes obtenidas con microscopia confocal de cortes transversales de hojas control de *Craterostigma*, ó B, tratadas con 100 μ M de ABA. C, Cortes de raíz control de *Craterostigma*, ó D, tratadas con 100 μ M de ABA. Las secciones de tejido fueron procesadas bajo las mismas condiciones utilizadas para *CpMYB10* (Villalobos *et al.*, 2004). Los iniciadores para *CpMYB5* son los siguientes: Cpm5 sense: 5'-AGCATCAGCTTTTTTGTGTC-3', y Cpm5 antisense: 5'-AACGTACGTCCTTGAATG-3'.

Para conocer la región regulatoria 5' de *CpMYB5*, se procedió a la subclonación de esta región a partir de la clona genómica que para este gen fue previamente reportada (Iturriaga *et al.*, 1996). A partir del mapa de restricción de la clona genómica de *CpMYB5* se realizó una doble digestión (Eco RI/Pst I), a partir de la cual se purificó un fragmento de 1.4 Kb que contenía a la región de interés (Fig. 13). Además de contener cerca de 1 Kb de la región regulatoria 5' de *CpMYB5*, este fragmento también incluye aproximadamente 400 pb de la región codificante de este gen. Dicho fragmento fue ligado en los sitios correspondientes del vector pSK, y una clona positiva denominada pEP5 fue secuenciada bidireccionalmente. La secuencia obtenida se presenta en la Figura 12. Con el objetivo de determinar la existencia de similitudes en las regiones 5' corriente arriba del ATG de los genes *CpMYB5* y *CpMYB10*, se realizó un alineamiento de las secuencias correspondientes (Fig.14). Como se muestra en este alineamiento, existen bloques idénticos de distintas longitudes a todo lo largo de ambas regiones (Fig. 14). Sin embargo, la región 5' de *CpMYB5* presenta una región de 50 pb (localizada a 630 pb del ATG) que no está presente en la región correspondiente de *CpMYB10*, siendo esta la diferencia más importante entre ambas regiones. Con el afán de analizar con mayor profundidad estas secuencias, se realizó un análisis utilizando la base de datos contenida en el programa computacional PLACE (Higo y Ugawa, 1999), el cual permite identificar elementos de acción en *cis* reportados en plantas. En la Fig. 15 se muestra un resumen de los principales elementos de acción en *cis* encontrados para ambas secuencias. Fue interesante encontrar que en ambas secuencias se encuentran paralelismos en el tipo y distribución de varios elementos en *cis*. Dentro de la zona de 50 pb de la secuencia de *CpMYB5* antes mencionada, se encontró un elemento de acción en *cis* tipo CE1 ("Coupling Element 1"), el cual participa en la regulación mediada por ABA de diversos genes (Shen y Ho, 1995).

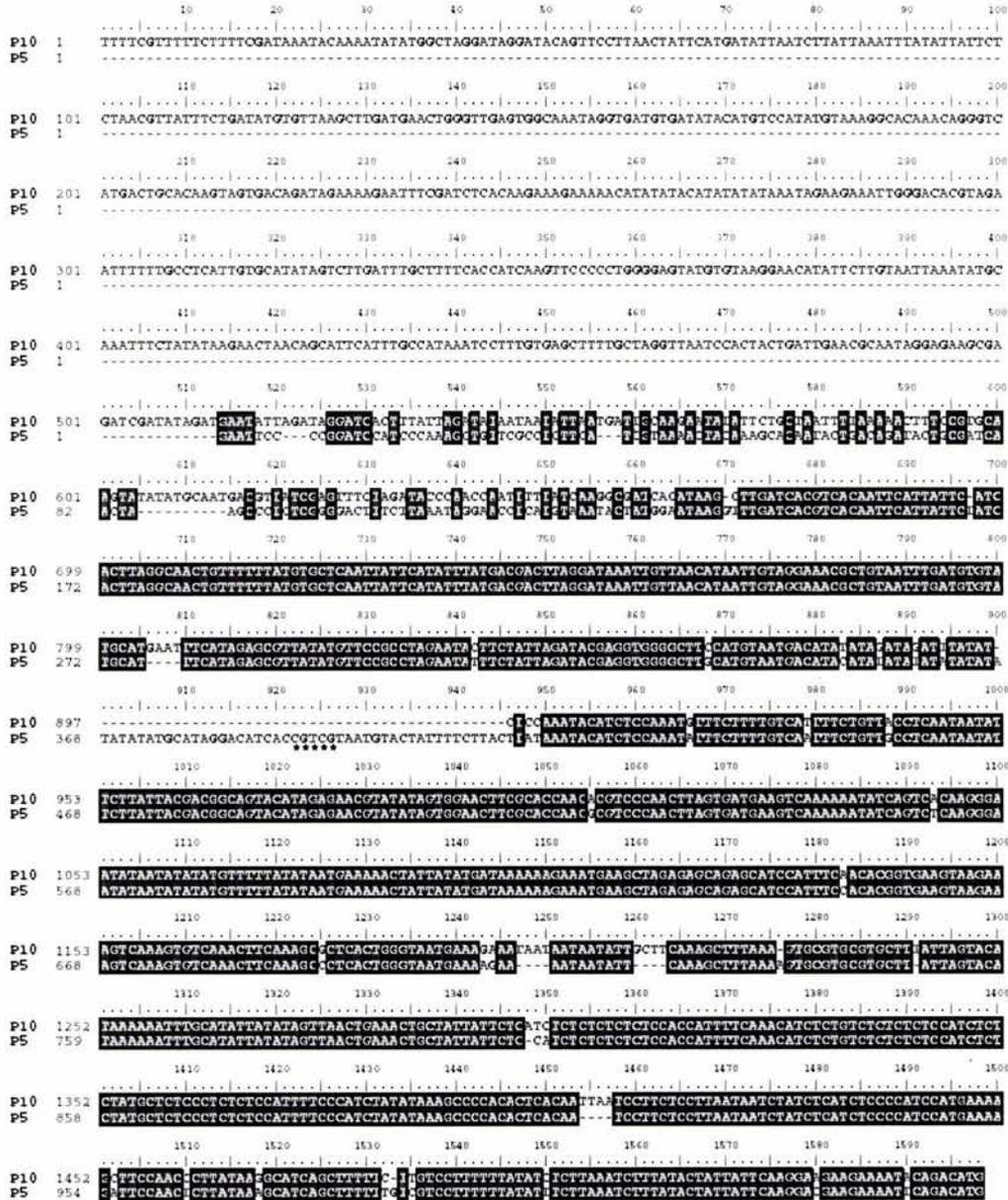
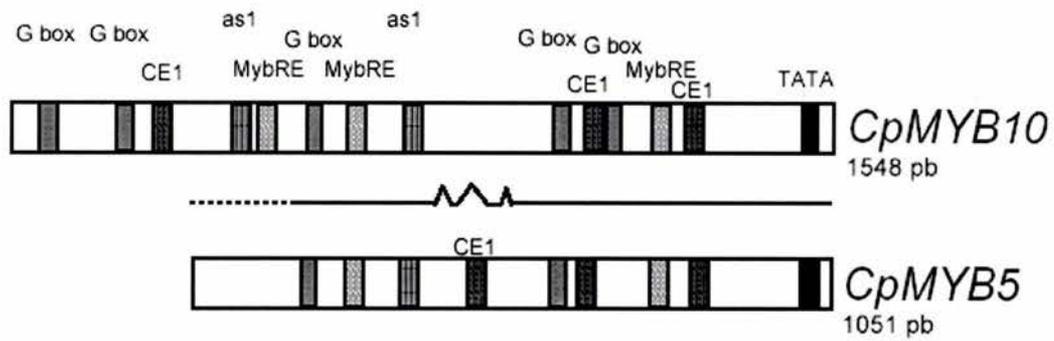


Fig. 14. Alineamiento de las regiones corriente arriba del ATG de los genes *CpMYB5* y *CpMYB10*. La región de *CpMYB10* es cerca de 500 bp mas larga que la de *CpMYB5*. Con asteriscos se marca la caja *CE1* presente en la región de 50 bp de *CpMYB5* que esta ausente en la región corriente arriba de *CpMYB10*.



	<i>CpMYB10</i>	<i>CpMYB5</i>
MybRE	3	2
as1	2	1
G box	5	3
CE1	3	3
TATA	1	1

Fig. 15. Análisis comparativo de los elementos de acción en cis putativos identificados en las regiones corriente arriba de los genes *CpMYB5* y *CpMYB10*.

Para analizar la participación de la región corriente arriba al ATG de *CpMYB5* en la regulación transcripcional de este gen, se construyó un plásmido recombinante que contenía al gen reportero GUS bajo la dirección de dicha región. Para ello, se utilizó el plásmido pEP5 como templado en una reacción de PCR diseñada para amplificar únicamente la región corriente arriba al ATG, flanqueándola con los sitios Eco RI (5') y BamHI (3'). Este PCR se digirió con las enzimas antes mencionadas, y posteriormente fue ligado en los sitios correspondientes del vector pBin19GUS-NOS (Bevan, 1984), creando así una fusión traduccional entre los ATGs de los genes *CpMYB5* y *uidA* (GUS). El plásmido resultante, p5/GUS-NOS, se movilizó a *Agrobacterium tumefaciens* C58 para transformar plantas de *Arabidopsis thaliana* (Col) bajo las mismas condiciones utilizadas previamente (Villalobos *et al.*, 2004). Se obtuvieron varias líneas heterocigas a partir de las cuales se aislaron 2 líneas homocigas independientes, mismas que fueron utilizadas para posteriores análisis histoquímicos en respuesta a varios estreses medio ambientales.

Análisis histoquímicos preliminares mostraron que el patrón de detección de GUS en respuesta a ABA, fue idéntico en ambas líneas transgénicas. La línea representativa 6.2 fue estudiada en mayor profundidad. La actividad de GUS detectada en las hojas cotiledonarias de plántulas de 10 días de edad fue muy similar en los tratamientos de 16 hr en presencia de ABA (100 μ M), NaCl (150 mM) y frío (4°C) (Fig. 16). Sin embargo, la intensidad de tinción es mayor en respuesta a deshidratación, y aparentemente cubre otros tipos celulares de la hoja (Fig. 16). En las plantas transgénicas P5/GUS bajo condiciones control no se detectó expresión basal en las hojas ni en la zona del meristemo apical en esta etapa de desarrollo, aunque sí existe una expresión basal en algunas zonas de las raíces control. Esta expresión basal radicular parece incrementarse únicamente en respuesta a deshidratación y NaCl, pero bajo el tratamiento de frío esta inducción se restringe al hipocotilo y a la zona de la raíz principal más próxima a este (Fig. 16). Bajo ninguna de las condiciones estudiadas se detectó expresión de GUS en la región apical de la raíz de estas plantas. No se realizaron ensayos fluorimétricos para medir la actividad de GUS en estas plantas.

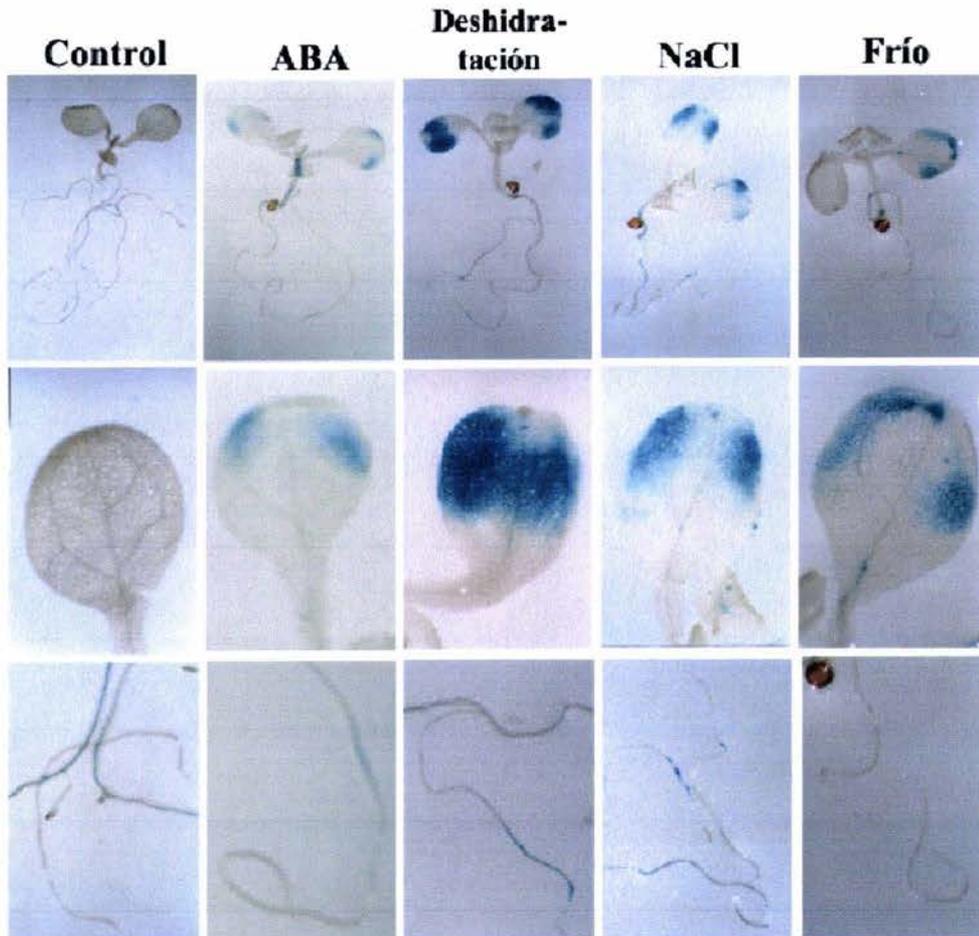


Fig. 16. Patrón de expresión de *CpMYB5* en plantas transgénicas de *Arabidopsis*. Análisis histoquímico de plántulas de 10 días de la línea homociga 6.2 que porta la construcción promotor *CpMYB5*-GUS. Las plantas fueron sometidas a los tratamientos de estrés indicados (16 hr en presencia de ABA 100 μ M, NaCl 150 mM, deshidratación, ó temperatura de 4°C. El procesamiento de las plantas fue igual al reportado previamente (Villalobos *et al.*, 2004).

V.2.2 Clonación y análisis de la secuencia del cDNA del gen *CpMYB10*.

Dado que para *CpMYB10* sólo existía una clona genómica (Iturriaga *et al.*, 1996), se requirió del aislamiento del cDNA correspondiente a este gen para poder utilizarlo en estudios de expresión ectópica de *Arabidopsis*. Para ello, se realizó un RT-PCR utilizando RNAs provenientes de hojas de *Craterostigma* tratadas con ABA, y los mismos oligos antes descritos específicos para *CpMYB10*. Se amplificó un producto de 1.1 Kb que fue clonado en el sitio Sma I del plásmido pSK+. Una clona positiva (pRTPCR10) fue secuenciada bidireccionalmente. La secuencia obtenida contiene 79 pb que corresponden a la región 5' UTR, el ORF completo, y 36 pb de la región 3' UTR de este gen (Fig. 17). La secuencia de aminoácidos deducida para *CpMYB10* se utilizó en un alineamiento múltiple con las secuencias correspondientes de *CpMYB5*, *CpMYB7* y *AtMYB2* (Fig. 18). Los porcentajes de identidad observados entre *CpMYB10* vs *CpMYB5* y *CpMYB7*, son de 98 y 96% respectivamente. La región de 101 aminoácidos que corresponde a las repeticiones MYB R2R3 se conserva un 92% de identidad entre las proteínas *CpMYB10*, *CpMYB5* y *CpMYB7*, y *AtMYB2*. Inmediatamente después del dominio MYB R3, existe una región de 31 aas. que presenta un 74% de identidad (87% de similitud) entre *AtMYB2* y las proteínas *CpMYB10*, *CpMYB5* y *CpMYB7*. El resto de la región correspondiente al C-terminal de *AtMYB2* (122 aa) es totalmente distinta a la región correspondiente de *CpMYB10*, *CpMYB5* y *CpMYB7*.

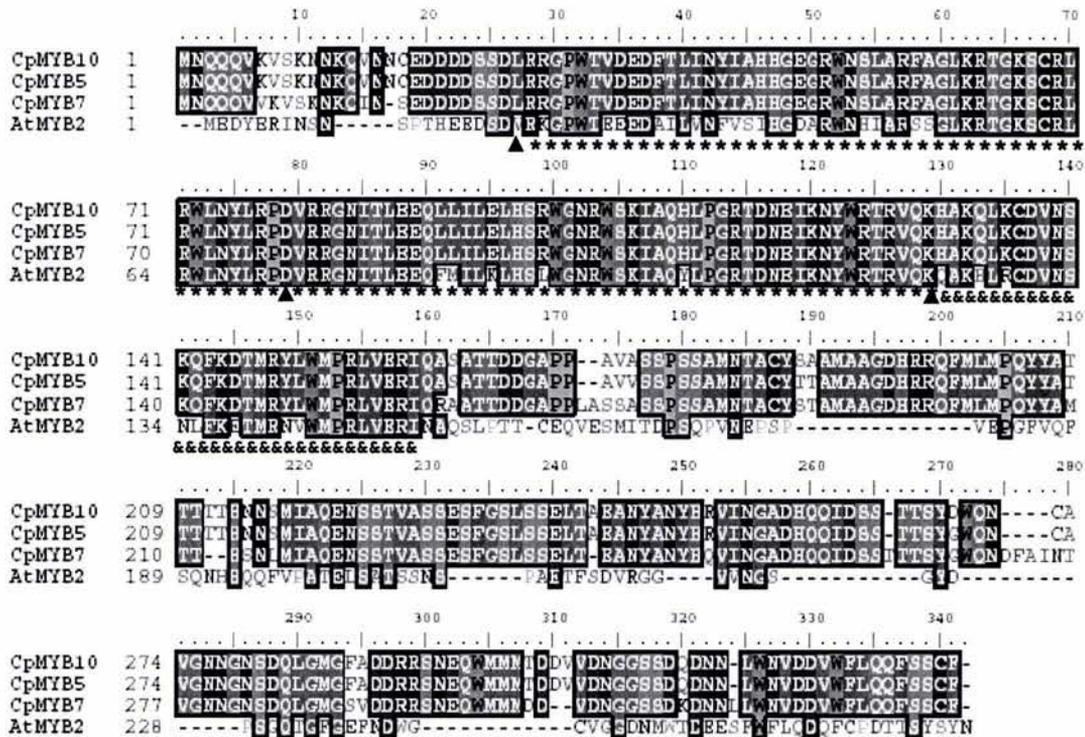


Fig. 18. Alineamiento múltiple de las proteínas CpMYB10, CpMYB5, CpMYB7 y AtMYB2. Las puntas de flecha indican el inicio y término de las repeticiones MYB R2R3 del dominio de unión a DNA (marcado como *). &, Región de 31 aa fuera del dominio MYB que se comparte entre AtMYB2, CpMYB10, CpMYB5 y CpMYB7.

V.2.2 Estudios adicionales del efecto de la sobre-expresión de *CpMYB10* en *Arabidopsis*

Las plantas que sobre-expresan *CpMYB10* no presentan alteraciones morfológicas, excepto por la presencia de un sistema radicular más desarrollado en plantas adultas crecidas en maceta respecto a la planta de tipo silvestre. El mayor crecimiento de la raíz también se manifiesta en plántulas jóvenes crecidas *in vitro* desde los 3 días de edad y se hace más evidente en plántulas de 7 días de edad (Fig. 19).

Con el fin de determinar los niveles de ABA presentes en las plantas transgénicas sobre-expresoras de *CpMYB10*, se determinaron las concentraciones de esta hormona en la línea representativa 11.5 y en la planta tipo silvestre. Se utilizaron extractos de plántulas de 15 d de edad crecidas *in vitro* bajo condiciones estándar (Villalobos *et al.*, 2004) siguiendo las instrucciones del fabricante (Phytodetek-ABA-kit; AGDIA Inc., Elkhart, IN). Los datos recogidos muestran que aparentemente la línea 11.5 no presenta alteraciones en su contenido de ABA (Tabla 1).

Con el fin de identificar proteínas expresadas diferencialmente en respuesta a *CpMYB10*, se realizaron geles bidimensionales de los proteomas de la línea 11.5 que sobre-expresa *CpMYB10* bajo la regulación del promotor constitutivo *35S* vs. una línea transgénica control que fue transformada únicamente con el vector *pBin35S-NOS*. Se utilizaron plántulas de 15 d tratadas con ABA 100 μ M por 16 hr, ó sin tratamiento. Como se puede apreciar en la Fig. 20, la gran mayoría de las proteínas de *Arabidopsis* se concentran en la zona ácida de pI. Para realizar un mejor análisis de esta zona, en lo subsiguiente se utilizaron geles bidimensionales enfocados únicamente en esta fracción (Fig. 21). Se encontraron varias proteínas expresadas diferencialmente en respuesta a ABA entre estos dos tipos de plantas, y 11 de ellas fueron identificadas mediante espectrometría de masas utilizando un equipo tipo MALDI-ToF (“Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight”). Algunas de estas proteínas muestran una clara relación con respuestas a estrés medioambiental, tales como: una proteasa dependiente de ATP, el factor transcripcional RAV2, la anhidrasa carbónica, la glutatión transferasa, una ascorbato reductasa dependiente de GSH, y la chaperonina HSP60.

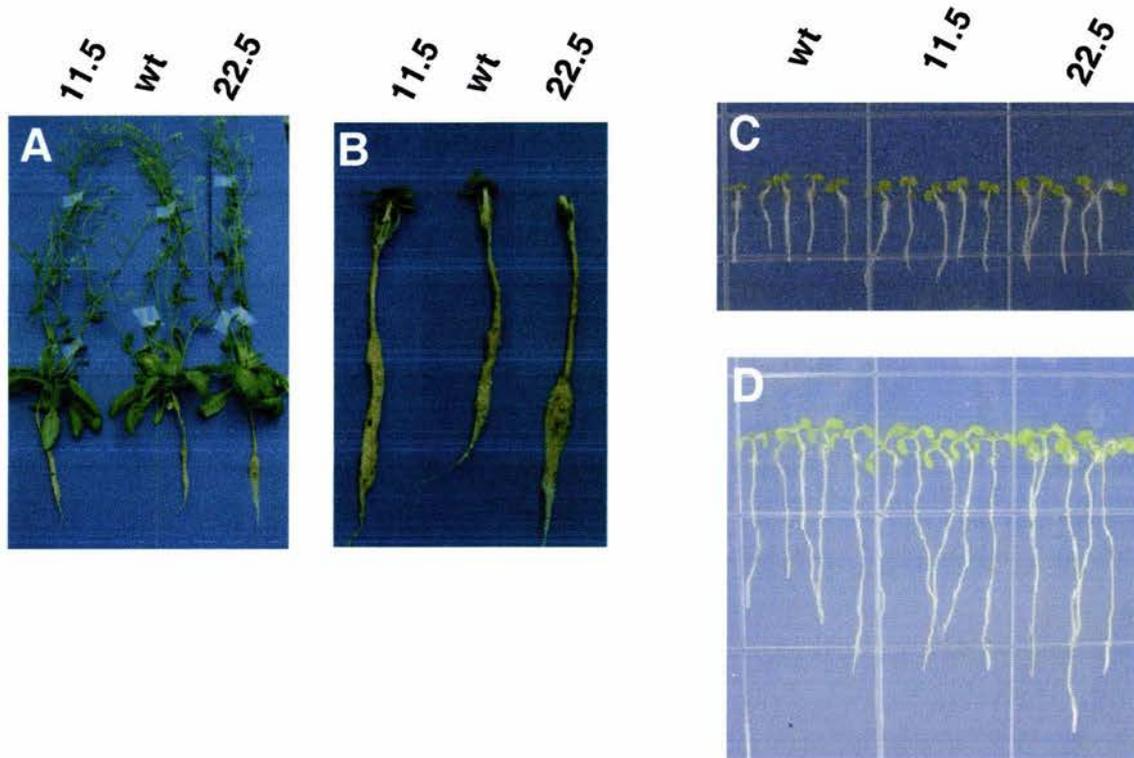


Fig. 19. La sobre-expresión de *CpMYB10* provoca un mayor desarrollo del sistema radicular de *Arabidopsis*. A. Plantas maduras (8 semanas) crecidas en maceta. B. Acercamiento de las raíces de las plantas mostradas en A, sin las partes aéreas. C y D. Plántulas crecidas *in vitro* de 3 y 7 días de edad, respectivamente. Las condiciones de crecimiento para ambos casos son las mismas reportadas previamente (Villalobos *et al.*, 2004). Se presentan individuos representativos de dos líneas transgénicas.

Planta	ABA (ng ABA/gr peso fresco)
wt	17 +/- 2
11.5	16 +/- 1

Tabla 1. Concentraciones de ABA en la línea transgénica representativa 11.5 que sobre-expresa *CpMYB10*. Se utilizaron 20 mg de tejidos pulverizados en mortero de plántulas de 15 d, los cuales se homogenizaron en un 1 ml de buffer de extracción de ABA (HCl 10 mM, PVP 1% en metanol). La extracción se condujo durante 16 hr con agitación constante a 4°C. El sobrenadante se neutralizó con 15 µl de NaOH 1M. Para la determinación de la concentración de ABA se siguieron las instrucciones de Phytodetek-ABA-kit (AGDIA Inc., Elkhart, IN). Los datos muestran los promedios de un solo experimento biológico realizado por triplicado.

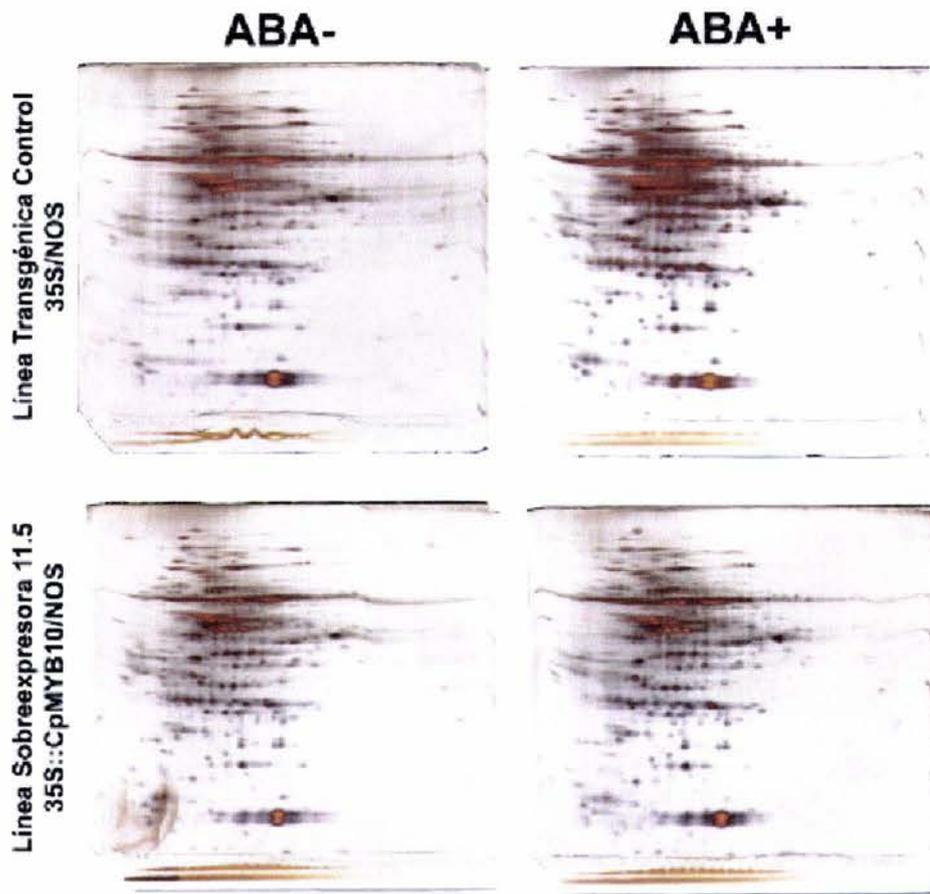


Fig. 20. Geles bidimensionales de los proteomas de la línea 11.5 que sobre-expresa *CpMYB10* bajo la regulación del promotor constitutivo *35S* vs. una línea transgénica control que fue transformada únicamente con el vector *pBin35S-NOS*. Se utilizaron plántulas de 15 d tratadas con ABA 100 μ M por 16 hr, ó sin tratamiento. El punto Isoeléctrico analizado es amplio (3-10). La fracción de proteínas ácidas se encuentra al lado izquierdo de cada gel.

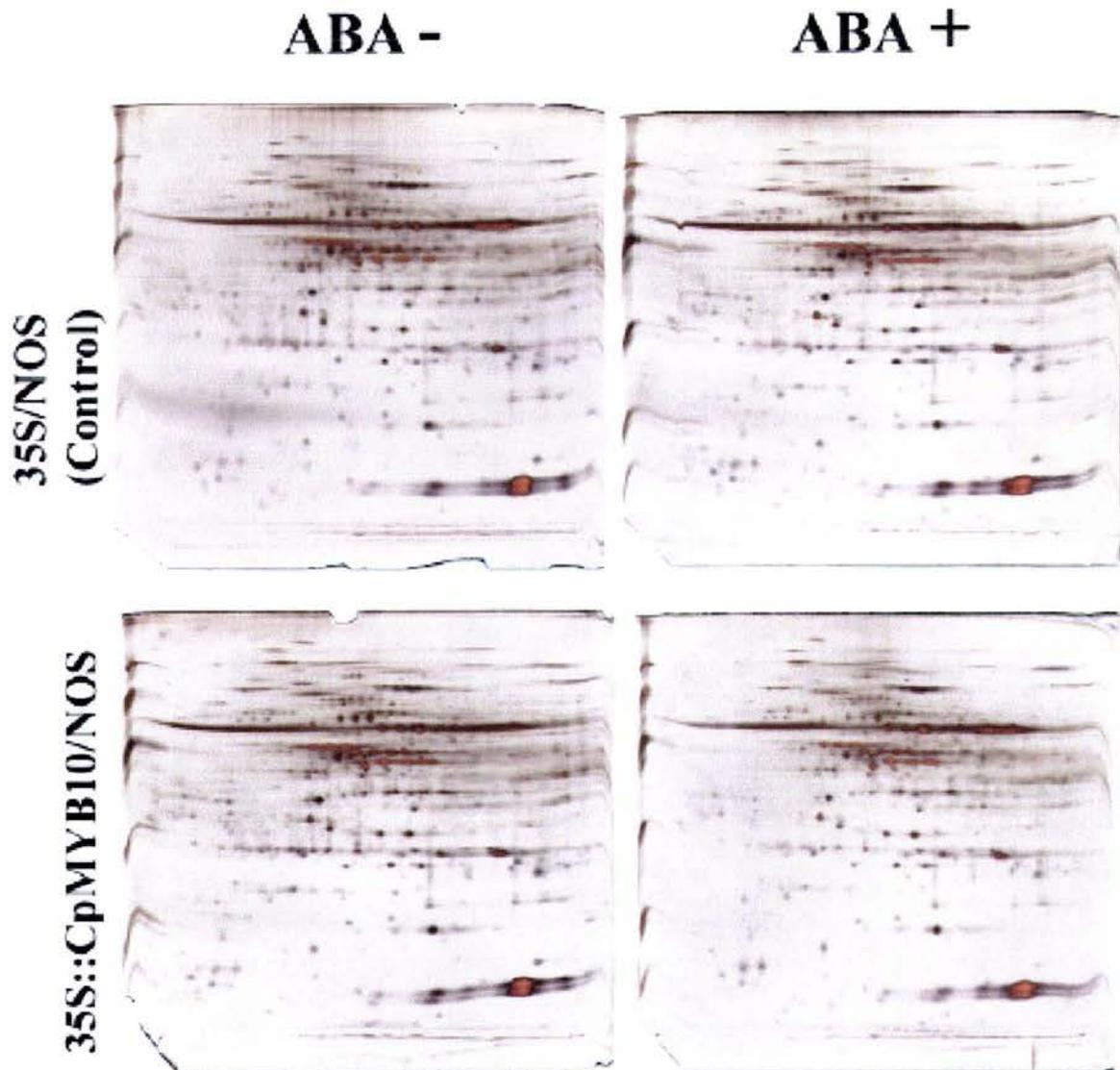


Fig. 21. Geles bidimensionales de los proteomas de la línea 11.5 que sobre-expresa *CpMYB10* bajo la regulación del promotor constitutivo *35S* vs. una línea transgénica control que fue transformada únicamente con el vector *pBin35S-NOS*. Se utilizaron plántulas de 15 d tratadas con ABA 100 μ M por 16 hr, ó sin tratamiento. El punto isoelectrico analizado es amplio (4-7). La fracción de proteínas mas ácidas se encuentra al lado izquierdo de cada gel.

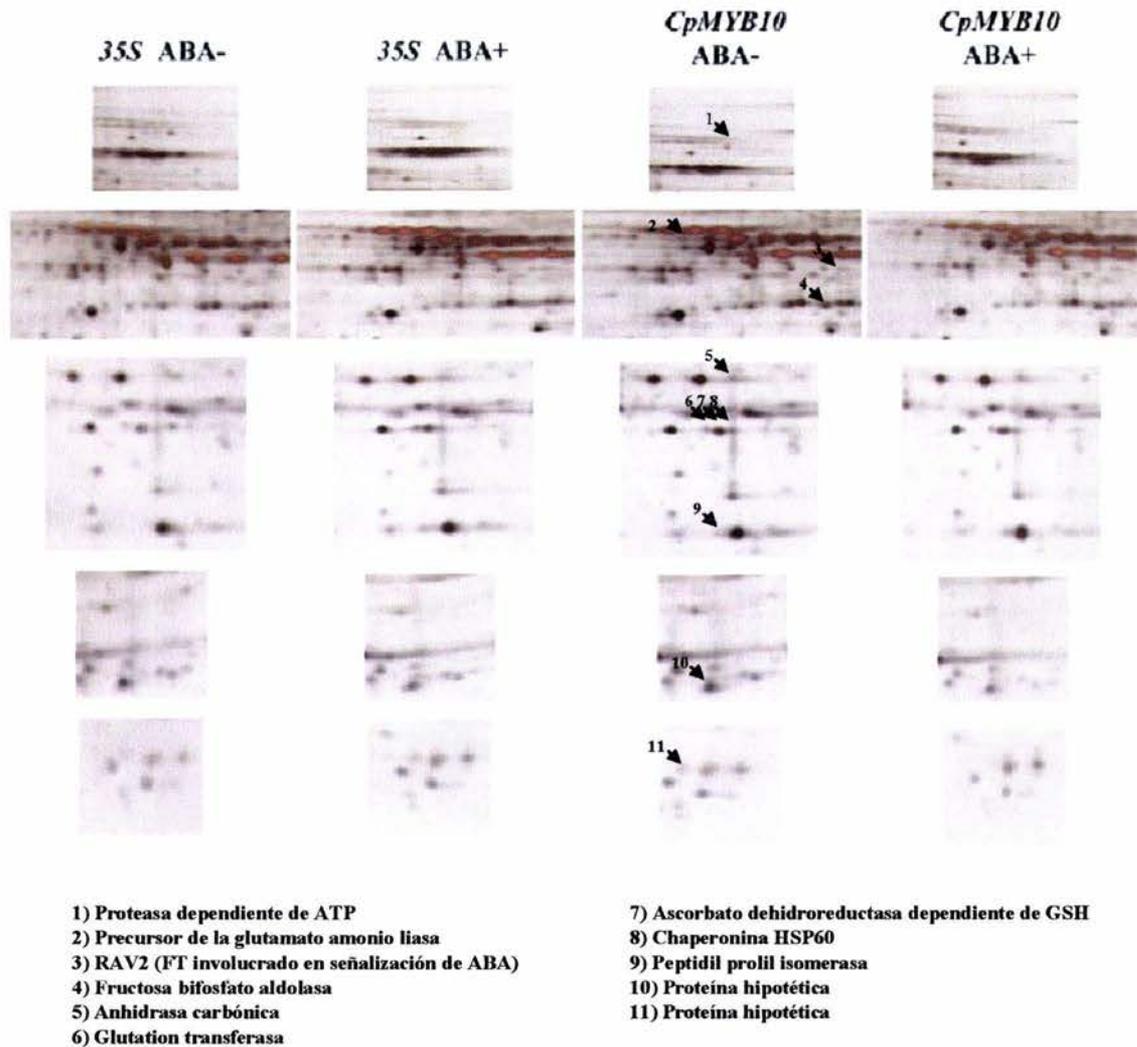


Fig 22. Proteínas expresadas diferencialmente en respuesta a ABA entre las plantas 35S-*CpMYB10* vs. las plantas control. Se muestran ampliaciones de ciertas regiones de los geles presentados en la Fig. 21. Algunas de estas proteínas fueron identificadas por espectrometría de masas utilizando un equipo tipo MALDI-ToF (“Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight”), y se muestran en la parte baja de la figura.

VI. DISCUSION

VI.1 CINÉTICAS DE EXPRESIÓN DE *CpMYB10*, *CpMYB5* Y *CpMYB7* EN RESPUESTA A ABA Y SEQUÍA.

En este trabajo se realizó un análisis detallado del patrón de expresión de *CpMYB10* utilizando varias estrategias: RT-PCR, RT-PCR *in situ*, y también mediante el uso de plantas transgénicas heterólogas que portan la fusión del promotor de *CpMYB10* con el gen reportero GUS. De hecho, el gen que en este trabajo fue estudiado con mayor profundidad fue *CpMYB10*, y le siguen *CpMYB5* y finalmente *CpMYB7*. Dos razones resultaron fundamentales para escoger RT-PCR como el método de estudio de *CpMYB10*: 1) Su bajo nivel de expresión, que difícilmente es detectado por “Northern”; y 2) el elevado nivel de identidad que presenta *CpMYB10* con los otros dos genes tipo MYB que también se analizaron en este trabajo (*CpMYB5* y *CpMYB7*). En cuanto a las regiones codificantes, la identidad presente entre *CpMYB10* y *CpMYB5* a nivel de nucleótidos es de 98.7%, mientras que con *CpMYB7* es de 90%. En términos de los aminoácidos deducidos de la secuencia nucleotídica, al compararse la identidad entre las proteínas completas de *CpMYB10* versus *CpMYB5* y *CpMYB7*, resulta en 98% y 96%, respectivamente. Esto sugiere que las tres proteínas pudieran estar realizando funciones redundantes en *Craterostigma*. De hecho, en el presente trabajo se clonó y secuenció el cDNA correspondiente a *CpMYB10*, a partir de los productos de PCR obtenidos en los análisis de expresión de este gen.

Datos previos reportados por Iturriaga y colaboradores (1996) muestran que el uso de una sonda común para estos tres *MYBs* en experimentos tipo “Northern”, la expresión de alguno (s) de estos genes es inducida por ABA en células de callos de *C. plantagineum* y en raíces sometidas a sequía, pero no se detectó su expresión en hojas ni en semillas de esta planta. Debido al alto nivel de identidad entre estos tres genes, en el trabajo mencionado resultó difícil atribuir los cambios de expresión observados a alguno de los genes en cuestión de manera específica. En esta tesis, se decidió abordar el problema utilizando RT-PCR, que es una técnica mucho más sensible y específica. Para la amplificación de *CpMYB10*, *CpMYB5* y *CpMYB7* se utilizaron oligonucleótidos específicos que amplifican toda la región codificante para cada uno de estos genes. Estos iniciadores específicos se anclan sobre las regiones UTR 5' y 3' de estos genes. De hecho, en el presente trabajo se clonó y secuenció el cDNA correspondiente a *CpMYB10*, a partir de los productos de PCR obtenidos en los análisis de expresión de este gen. La

secuencia determinada del producto amplificado resulto ser igual a la secuencia esperada para *CpMYB10*.

Se realizaron cinéticas de expresión de *CpMYB10* en plantas de *Craterostigma* tratadas con ABA ó deshidratación, y a solo unos cuantos minutos (min) de haberse iniciado el tratamiento, tanto en hojas como en raíces de *Craterostigma* se induce la expresión del gen *CpMYB10* en respuesta a deshidratación y también a ABA. En las hojas, la expresión máxima de *CpMYB10* se alcanza a los 15 min de deshidratación, y de hecho esta expresión va decayendo con el paso del tiempo. La rápida inducción observada y el repentino decaimiento de la expresión de *CpMYB10*, sugiere que este gen pudiera tener un papel clave en la activación de genes de respuesta a estrés hídrico en las hojas de *Craterostigma*. En cambio, en las raíces de *Craterostigma* sometidas a deshidratación se observó un patrón de expresión bifásico, ya que se observa la inducción desde los 15 y se mantiene a los 30 min de tratamiento, pero existe una desaparición repentina del transcrito a 1 hora de iniciado el tratamiento. El transcrito vuelve a detectarse, aunque débilmente, a las 3 hrs, para posteriormente volver a incrementarse a niveles semejantes a los iniciales hasta las 16 y 48 hrs (que fueron los tiempos más largos analizados en el experimento). Este tipo de inducción bifásica también ha sido observado en los genes *AREB1* y *AREB2* de *Arabidopsis*. Estos genes codifican para FTs tipo b-ZIP que participan en la regulación de la *LEA rd29B* (Uno *et al.*, 2000). Es probable que esta respuesta bifásica signifique que *CpMYB10* pudiera estar regulando dos grupos distintos de genes, aunque no se puede descartar que en ambos picos de expresión los blancos de *CpMYB10* sean los mismos. Por otro lado, en respuesta a ABA el gen *CpMYB10* presenta respuestas distintas a las observadas ante deshidratación. En hoja y raíces de *Craterostigma* el tratamiento con ABA enciende la expresión de *CpMYB10* desde los 15 min, y esta inducción se mantiene durante el transcurso del experimento. A principios de los años noventa, se reportó que cuando las plantas de *Craterostigma* son sometidas a deshidratación por 30 min, el contenido relativo de agua (RWC) es de aproximadamente 90%, y que también se observa la expresión inducida de varios genes (Bartels *et al.*, 1990). A las 16 hr de deshidratación, el RWC es de aproximadamente 20%, y baja a 2.5% si la deshidratación se prolonga hasta las 48 hr. De hecho, a los dos días de deshidratación el estado general observado en las hojas de *Craterostigma* es el siguiente: se ha perdido la clorofila, existen cambios ultraestructurales evidentes (como el enrevesamiento de las paredes celulares), encogimiento de organelos, y pérdida de la grana cloroplastica (Bartels *et al.*, 1990). Por lo tanto, es probable que en *Craterostigma*, *CpMYB10* transactive tanto genes de respuesta temprana como también de respuesta tardía.

Las respuestas que presenta el gen *CpMYB5* ante sequía y ABA son distintas a las de *CpMYB10*. Al menos dentro de los tiempos que fueron analizados, no se detectó el transcrito de *CpMYB5* en hojas de *Craterostigma* deshidratadas. A semejanza de la respuesta de *CpMYB10*, en raíces deshidratadas de *Craterostigma* se también observó una respuesta bifásica de *CpMYB5*, ya que el transcrito se detecta a los 30 min y desaparece desde 1-3 hrs del tratamiento, para volverse a detectar a las 16 hrs. Por lo que respecta a los tratamientos con ABA, en hojas de *Craterostigma* se detectó la acumulación de *CpMYB10* desde los 15 min, pero su transcrito fue apenas detectable a los desde 1 hr de tratamiento hasta las 48 hr que fue el tiempo más tardío analizado en el experimento. En raíces de *Craterostigma* tratadas con ABA, se detectó una débil expresión basal de *CpMYB10* en el control (raíces expuestas a agua durante 48 hrs). Sin embargo, desde los 15 min se puede observar un aumento en la acumulación del transcrito de *CpMYB5*, y estos niveles suben y bajan a lo largo de la cinética, aunque no desaparecen. Esto podría sugerir que existe una expresión bifásica de *CpMYB5* en las raíces de *CpMYB10*, tanto en respuesta a ABA con también ante sequía.

Bajo las mismas condiciones descritas se analizó la expresión de *CpMYB7*, aunque nunca se detectó la acumulación de su transcrito. Solo en un experimento del cual no se realizaron repeticiones, se detectó una ligera acumulación de *CpMYB7* en hojas de *Craterostigma* tratadas con ABA. Estos datos indican que *CpMYB7* podría tener una nula (ó escasa) participación en la regulación de las respuestas de *Craterostigma* ante ABA y sequía, al menos bajo las condiciones analizadas. La clona de cDNA que para *CpMYB7* aislaron Iturriaga y colaboradores (1996) fue obtenida a partir de un banco de cDNA preparado a partir de callos de *Craterostigma* tratados con ABA. En los callos, al ser masas de células indiferenciadas, es posible que los mecanismos de regulación de *CpMYB7* sean distintos a los presentes en una planta completa. Aún más, en este trabajo siempre se utilizaron plantas jóvenes de *Craterostigma*. No se puede descartar que *CpMYB7* responda ABA o sequía en otros estados de desarrollo, ó inclusive otros tejidos que no fueron analizados en este trabajo (ej. flores, semillas).

VI.2 PATRONES DE EXPRESIÓN DE *CpMYB10* Y *CpMYB5* EN HOJAS Y RAÍCES DE *CRATEROSTIGMA*

Los patrones de expresión obtenidos para los dos genes analizados, *CpMYB10* y *CpMYB5*, son consistentes con la participación de ambos en la regulación de la tolerancia a estrés en *Craterostigma*. En

el inicio del análisis, se intentaron técnicas convencionales de hibridación *in situ* que resultaron infructuosas debido al bajo nivel de expresión que presentan ambos genes. En un intento por lograr una hibridación más específica, se usó sin éxito el marcaje tanto radioactivo como no radioactivo (DIG) de sondas que cubrían las regiones carboxilo terminal de *CpMYB10* ó de *CpMYB5* sin las regiones correspondientes a los dominios MYB que son muy conservados entre los genes de la familia. Finalmente, los patrones de expresión de *CpMYB10* y *CpMYB5* fueron determinados utilizando la técnica de RT-PCR *in situ* descrita por Xoconostle-Cázares y colaboradores (1999). El uso de esta técnica resultó idóneo para los objetivos de este trabajo, ya que al mismo tiempo que permite amplificar transcritos de baja expresión, también da el mismo nivel de sensibilidad del PCR, ya que se usan oligos específicos para el gen en cuestión.

Utilizando cortes *in vivo* hechos a mano sobre tejidos de *Craterostigma* tratados con ABA, el transcrito de *CpMYB10* se detectó en los siguientes tipos celulares de las hojas: epidermis, parénquima esponjoso y de empalizada, y haces vasculares. En raíces tratadas con ABA, la localización del transcrito de *CpMYB10* se restringió a los cilindros vasculares y a algunas células aisladas del córtex. Por lo que respecta a los tejidos control, se detectó una señal muy débil del transcrito de *CpMYB10* en la epidermis y en algunas células del córtex y haz vascular. La expresión de *CpMYB10* en raíces control fue totalmente indetectable. Estos datos indican que en respuesta a ABA, el transcrito de *CpMYB10* se incrementa de forma rápida y drástica en ciertos tipos celulares muy particulares de hojas y raíces de *Craterostigma*. Relacionando estos datos con los encontrados para *CpMYB10* en respuesta a CHX, es probable que exista un represor con afinidad al promotor de *CpMYB10* que permita únicamente la expresión basal de este gen, y que en condiciones de estrés se libere el promotor permitiendo así la acumulación del transcrito que al traducirse ira a regular a sus genes blancos. El hecho de que la proteína *CpMYB10* tenga la capacidad de unirse a su propio promotor podría sugerir que *CpMYB10* estuviera autoregulando a su propio promotor.

Por lo que respecta a *CpMYB5*, se observó una acumulación drástica de su transcrito, pero a diferencia con *CpMYB10*, en hojas tratadas con ABA la expresión de este gen se restringe a las células del parénquima. Aparentemente no existe expresión de *CpMYB5* en la epidermis de las hojas de *Craterostigma*. En las hojas control, de detecto una señal muy débil de *CpMYB5* en células aisladas del parénquima. En los cortes de raíces control, se observó una señal muy débil que se restringe a los haces vasculares, pero esta señal se incrementa drásticamente en las células del córtex cuando las raíces son tratadas con ABA. Especialmente el patrón de expresión de *CpMYB5* y *CpMYB10* en las raíces, indica

que ambos genes responden a ABA pero en distintos tipos celulares, lo cual sugiere que podrían estar controlando la expresión de genes blanco cuya expresión es requerida en distintos tipos celulares.

VI.3 LOS PROMOTORES DE *CpMYB10* Y *CpMYB5* REGULAN LAS RESPUESTAS DE UN GEN REPORTERO ANTE ABA Y ESTRÉS EN EL FONDO GENÉTICO DE ARABIDOPSIS.

El papel del gen *CpMYB10* en las respuestas a estrés medioambiental quedó respaldado cuando se analizó su promotor en el fondo heterólogo de Arabidopsis. Estos experimentos muestran la inducción del gen GUS regulado por el promotor de *CpMYB10* (P10) en las plantas transgénicas de Arabidopsis en respuesta a ABA y deshidratación. Cuando estas plantas son sometidas a estrés por deshidratación se observó la expresión de GUS en los tejidos vasculares de hojas, pero esta inducción fue aún más fuerte en la punta de las raíces, zona del meristemo apical, y hojas emergentes. Se sabe que las raíces y la cofia radicular participan en la percepción del estatus hídrico del ambiente, y activan la translocación de ABA de las raíces a los tallos (Zhang *et al.*, 1987). Tomando en cuenta lo anterior, es probable que *CpMYB10* juegue un papel importante en este proceso. En el segundo tratamiento analizado en las plantas transgénicas portadoras de la fusión P10/GUS, el ABA induce una respuesta todavía mas fuerte en todos los tejidos vegetativos, aunque no se detectó tinción por GUS en las puntas de las raíces. La cuantificación de la actividad de GUS mostró que a pesar de que al nivel de la planta completa el ABA induce la respuesta más fuerte, el tratamiento por deshidratación induce una actividad de GUS 2 veces mas fuerte en las raíces. Además, en respuesta a ABA la inducción máxima de GUS se observó en plántulas de 6 días de edad, mientras que en la caso de la deshidratación, el pico máximo de inducción de GUS se alcanzó en plántulas de 21 d. Por el otro lado, en las plantas sin estrés la actividad de GUS se detectó débilmente en la región del meristemo apical, mientras que en la actividad de GUS fue muy fuerte en granos de polen. La expresión del P10 en los granos de polen maduros probablemente este reflejando el hecho de que este tejido se encuentra programado para la tolerancia a la deshidratación, y tal vez, sugiriendo que *CpMYB10* participa en la regulación de genes del polen que responden a estrés. Sin embargo, no se puede descartar que ocurran eventos de regulación postranscripcional en las plantas transgénicas, ya que la región UTR 5' de *CpMYB10* se encuentra presente en la construcción usada para transformar Arabidopsis. También es probable que otras regiones, como la región UTR 3' ó regiones intergénicas de *CpMYB10*, sean requeridas para la regulación de este gen.

Las respuestas a estrés son distintas en los análisis histoquímicas de las transgénicas de *Arabidopsis* que portan el promotor de *CpMYB5* (P5) fusionado al gen GUS. Para obtener esta construcción, primero se procedió a subclonar y secuenciar alrededor de 1 Kb correspondiente a la región promotora de *CpMYB5*. La actividad de GUS detectada en las hojas de estas plantas fue prácticamente la misma en los tratamientos de ABA, NaCl y frío (4°C), aunque la inducción es mayor en respuesta a deshidratación y aparentemente cubre otros tipos celulares de la hoja. A diferencia de lo observado en el caso de P10, en plantas transgénicas P5/GUS control no se detectó expresión basal en las hojas ni en la zona del meristemo apical. Sin embargo, si existe una expresión basal en algunas zonas de las raíces control. Esta expresión basal radicular parece incrementarse únicamente en respuesta a deshidratación y NaCl, pero bajo el tratamiento de frío esta inducción se restringe a la zona más apical de la raíz principal. Además, a diferencia del P10, no existe expresión de GUS en las puntas de las raíces de las plantas P5/GUS. No se puede descartar, al igual que para el caso de P10, que para la regulación de *CpMYB5* sean importantes otras regiones no incluidas en la construcción usada para transformar *Arabidopsis*. Existe una gran identidad entre las regiones promotoras de *CpMYB10* y de *CpMYB5*. Muchas de las regiones en *cis* predichas para el promotor de *CpMYB10* también se encuentran en P5, aunque existen algunas diferencias en el número y disposición de ellos. Estas sutiles diferencias entre las secuencias de ambos promotores se suman a las diferencias ya discutidas en la expresión de GUS mediada por P10 y por P5 para explicar sus distintos comportamientos. Lo que queda claro, es que ambos promotores responden a ABA y sequía. Las transgénicas que portan P5/GUS no fueron posteriormente analizadas a las mismas edades a que fueron analizadas las plantas P10, y tampoco se cuantificaron las actividades de GUS. Para poder hacer un análisis comparativo más real, será interesante complementar este análisis a las mismas edades.

VI.4 *CpMYB10* ES UN GEN DE RESPUESTA PRIMARIA

Tanto en animales como en plantas, el uso de inhibidores de la síntesis de proteínas en estudios de transcripción ha permitido la caracterización de genes cuya inducción es estimulada aún en la ausencia de síntesis de proteínas. A este tipo de genes se les consideran como genes de respuesta primaria, y resulta interesante que muchos FTs presentan este tipo de respuesta independiente de la síntesis de proteínas *de novo* y por ello son considerados como genes de respuesta primaria. (Herschman, 1991;

Fujimoto *et al.*, 2000). Los genes de respuesta secundaria son aquellos genes que requieren de la síntesis de proteínas *de novo* para su expresión. En base a este razonamiento, se decidió analizar la expresión de *CpMYB10* en presencia de un inhibidor de la síntesis de proteínas conocido como cicloheximida (CHX). Cuando los tejidos de *Craterostigma* son tratados únicamente con CHX, se observó una respuesta muy rápida en la acumulación del transcrito de *CpMYB10*. Por el contrario, el gen utilizado como control de respuesta a ABA (*LEA Cp11-24*) se mantiene apagado, lo cual sugiere que *CpMYB10* es un gen de respuesta temprana y que *Cp11-24* es de respuesta tardía. Además, la inducción de *CpMYB10* en respuesta a CHX sugiere que se está inhibiendo la traducción de un represor de *CpMYB10*, y por lo tanto el promotor de *CpMYB10* queda libre y permite la transcripción de este a partir de componentes de la maquinaria transcripcional preexistentes al momento de iniciar el tratamiento. Otra explicación probable para la acumulación del transcrito de *CpMYB10* en la ausencia de síntesis de proteínas, es que el mRNA de *CpMYB10* se está liberando de la degradación por parte de una RNasa lábil que está siendo inhibida por CHX. En las plantas, estos mismos criterios experimentales han sido usados en la caracterización de varios genes de respuesta primaria a distintos estímulos (Koshiba *et al.*, 1995; Fujimoto *et al.*, 2000; Bouquin *et al.*, 2001; Laskowski *et al.*, 2002).

VI.5 CPMYB10 SE UNE A SU PROPIO PROMOTOR Y AL DE LA LEA Cp11-24

La actividad de unión a DNA del FT *CpMYB10* se elucidó al analizar las propiedades de una versión recombinante de esta proteína (r*CpMYB10*) mediante ensayos tipo EMSA (“Electrophoretic Mobility Shift Assay”). Los resultados obtenidos muestran que la proteína r*CpMYB10* posee la actividad de unirse a DNA, y que esta unión es específica para dos motivos MYB (TAACTG y GAACTA). El elemento MYB TAACTG se encuentra presente en el promotor de *CpMYB10*, mientras que la secuencia GAACTA se presenta en la región promotora de *Cp11-24*. La secuencia TAACTG también es el sitio de reconocimiento de la proteína AtMYB2 (Urao *et al.*, 1993), la cual es la proteína de *Arabidopsis* con homología más cercana a *CpMYB10*. La unión de r*CpMYB10* al elemento MYB del promotor de *Cp11-24* sugiere que esta LEA (“Late-Embryogenesis Abundant”) podría ser uno de los blancos del FT *CpMYB10*. En las hojas de *Craterostigma*, el gen *Cp11-24* se induce desde los 30 min en respuesta a deshidratación (Bartels *et al.*, 1990). El gen *Cp11-24* codifica para una proteína tipo LEA que junto con otras proteínas está involucrada en la tolerancia a estrés (Ingram y Bartels, 1996). Como se mencionó

anteriormente, la proteína rCpMYB10 también se une a un elemento MYB presente en su propio promotor. Esto podría indicar un probable mecanismo de autorregulación del gen *CpMYB10*. Este tipo de mecanismos también han sido observados en otros genes vegetales (Schwarz-Sommer *et al.*, 1992; Finkelstein y Lynch, 2000), aunque no se puede excluir la posibilidad de que exista otro FT tipo MYB que pudiera regular al promotor de *CpMYB10*. Al analizar la secuencia deducida para CpMYB10, Iturriaga y colaboradores (1996) observaron tres sitios probables para fosforilación en esta proteína. Por los resultados obtenidos en este trabajo, aparentemente no se requiere de la fosforilación de CpMYB10 para su actividad de unión a DNA *in vitro*.

VI.6 LA EXPRESIÓN ECTÓPICA DE *CpMYB10* CONFIERE FENOTIPOS DE TOLERANCIA A ESTRÉS E INSENSIBILIDAD A GLUCOSA A PLANTAS TRANSGÉNICAS DE ARABIDOPSIS.

Uno de los descubrimientos más importantes del presente estudio fue que la sobre-expresión de *CpMYB10* (mediada por el promotor 35S) en Arabidopsis confiere tolerancia a deshidratación y a salinidad en plantas adultas crecidas en maceta, y también aumenta la tolerancia a estrés osmótico a plántulas transgénicas que han germinado en condiciones estresantes. En la literatura existen algunos reportes en donde la sobre-expresión de otros FTs induce un aumento en la tolerancia a estrés. Por ejemplo, la sobre-expresión del FT *CBF* en plantas de Arabidopsis, provoca un incremento a la tolerancia de temperaturas de congelamiento (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998). También, cuando se sobre-expresa el FT conocido como *DREBA1* se observó un incremento en la tolerancia a frío, sequía, y estrés por salinidad. Sin embargo, la expresión constitutiva de este gen (*DREB1A*) provoca un retraso en el crecimiento de las plantas, mientras que cuando se usó un promotor inducible solo se observaron incrementos mínimos en su tolerancia a estrés (Kasuga *et al.*, 1999). Por otro lado, la sobre-expresión de *CpMYB10* no presenta retraso alguno en el crecimiento de las plantas ni ningún otro fenotipo indeseable, solo se observó un incremento en la cantidad de raíces secundarias, y una raíz principal más larga. Como se mencionó anteriormente, se sabe que las raíces participan en la percepción del estatus hídrico del ambiente (Zhang *et al.*, 1987). Tomando en cuenta las cinéticas y patrones de expresión de *CpMYB10* y los fenotipos observados al sobre-expresarlo en Arabidopsis, se puede sugerir que *CpMYB10* podría estar participando en la promoción del crecimiento radicular y en su diferenciación. En contraste con los datos obtenidos en esta tesis, se reportó que la sobre-expresión de *AtMYB2* en Arabidopsis genera plantas

enanas que no muestran incrementos en su tolerancia a estrés (Abe *et al.*, 2003). Sólo cuando *AtMYB2* es co-expresado junto con *AtMYC2* se presenta un incremento moderado en la tolerancia a estrés (determinado en ensayos de liberación de electrolitos en presencia de manitol), pero al igual que la expresión individual de *AtMYB2*, estas plantas también presentan un severo retraso en su crecimiento. En contraste, la sobre-expresión de *CpMYB10* de manera individual, es suficiente para aumentar la tolerancia de *Arabidopsis* a condiciones severas de sequía y salinidad.

En otro orden de ideas, además de tener una función esencial en el metabolismo de las plantas, los azúcares también juegan un papel importante en la regulación del desarrollo y en otros procesos fisiológicos, tales como la fotosíntesis, fotomorfogénesis, floración, y germinación (Smeekens, 2000). En este trabajo, se encontró que la sobre-expresión de *CpMYB10* en *Arabidopsis* también confiere insensibilidad a altas concentraciones de azúcares, además de una respuesta de hipersensibilidad a ABA. En la literatura existen reportes del aislamiento de mutantes de *Arabidopsis* que exhiben un desarrollo normal y enverdecimiento cotiledonarios cuando son germinadas en altas concentraciones de glucosa (Glc). Se ha reportado la identidad molecular de algunas de estas mutantes (Arenas-Huerta *et al.*, 2000; Finkelstein y Lynch, 2000). Dos de los genes identificados en estos tamizados corresponden a los FTs *ABI4* y *ABI5*. Como se mencionó anteriormente, las mutantes *abi4* y *abi5* fueron identificadas inicialmente en tamizados que buscaban mutantes insensibles a ABA. Sin embargo, no se conocen a ciencia cierta los mecanismos moleculares por medio de los cuales las mutantes *abi4* y *abi5* afectan las respuestas a azúcares y a estrés. Una probable explicación para los fenotipos de insensibilidad a ABA observados en las plantas sobre-expresoras *35S-CpMYB10*, era que existiera una mayor producción de ABA en estas plantas. Sin embargo, en este trabajo también se midieron los niveles de ABA en una de las líneas transgénicas, los cuales resultaron ser prácticamente los mismos que los de las plantas silvestres. Otra posible explicación para los fenotipos observados en las transgénicas que sobre-expresan *CpMYB10*, es que la presencia de esta proteína heteróloga provoque la expresión constitutiva de al menos una parte de la batería de genes de *Arabidopsis* que participan en la vía de señalización de ABA, provocando de esta manera el fenotipo de hipersensibilidad a ABA. Se ha propuesto que *ABI4* y *ABI5* participan como intermediarios de ambas vías (ABA y azúcares), sugiriendo que existen intersecciones en algunos puntos de ambas rutas de señalización (Arenas-Huerta *et al.*, 2000). Además, un reporte reciente muestra que *ABI4* y *ABI5* tienen cinéticas y patrones de expresión distintas cuando las plantas son retardadas en presencia de altas concentraciones de azúcares o en presencia de ABA (Arroyo *et al.*, 2003), lo cual sugiere que el estado fisiológico de las plantas es lo que determina la expresión de estos

genes. Dicho de otra manera, *ABI4* responde en un cierto momento de la vía de señalización de ABA, mientras que la expresión de *ABI4* inducida por azúcares puede llegar a ser totalmente distinta en tiempo y espacio, y lo mismo parece ocurrir con *ABI5* (Arroyo *et al.*, 2003). Es probable que la sobre-expresión de *CpMYB10* este provocando un efecto negativo en la expresión de algún regulador importante de la señalización de azúcares. Curiosamente, en las plantas sobre-expresoras de *CpMYB10* no se observaron cambios sustanciales en la expresión de *ABI4* ni de *ABI5*. Sin embargo, es probable que si se encuentre modificada la expresión de otros reguladores de la vía todavía desconocidos. En contraste, a pesar de que la sobre-expresión de *AtMYB2* también induce un fenotipo de hipersensibilidad a ABA, no se reportó algún efecto en la respuesta a azúcares.

Una pregunta indispensable a contestar, era el conocer que genes de *Arabidopsis* eran los responsables de los fenotipos de tolerancia a estrés que se observaron al sobre-expresar *CpMYB10*. Para resolver este punto se analizó la expresión de 17 genes involucrados en la tolerancia a estrés, en la percepción y metabolismo de azúcares, o bien en la biosíntesis y señalización de ABA. Estos genes analizados fueron seleccionados por presentar motivos tipo MYB en sus promotores. Resulta interesante que 8 de estos genes mostraron algún tipo de alteración en su expresión en las plantas sobre-expresoras de *CpMYB10*. Por ejemplo, los transcritos de los genes que codifican proteínas hidrofílicas *RD29A* y *COR15a*, y también de la alcohol deshidrogenasa *ADH1*, se encuentran sobre-expresados cuando las plantas *35S-CpMYB10* son pre-tratadas con ABA. Se reportó previamente que tanto la sobre-expresión de *DREB1A*, así como también la de *CBF1* (ambos son FTs de respuesta a estrés), provocan un aumento de la expresión de varios genes que codifican proteínas tipo LEA, entre los que se incluyen *RD29A* y *COR15a* (Jaglo-Ottosen., 1998; Kasuga *et al.*, 1999). En contraste, la sobre-expresión de *AtMYB2* en *Arabidopsis* solamente activa la expresión de *ADH1*, aunque la co-expresión de *AtMYB2* y *AtMYC2* induce un aumento en los niveles de expresión de varios genes, entre ellos *RD22*, *COR6.6*, y *SUS1* (Abe *et al.*, 2003). En el presente trabajo también se encontró que en las plantas sobre-expresoras de *CpMYB10* crecidas bajo condiciones control, existe represión de la expresión de varios genes de respuesta a estrés, entre ellos: *RD22*, *COR15a*, y *P5CS1*. Lo anterior sugiere que dependiendo de las condiciones prevalecientes, *CpMYB10* pudiera estar funcionando como activador, o bien, como un represor. Para conocer con mayor profundidad los efectos de la sobre-expresión de *CpMYB10* sobre la expresión génica general, sería realmente interesante la realización de un análisis más amplio utilizando microarreglos de *Arabidopsis*.

En otro intento por conocer el efecto de la sobre-expresión de *CpMYB10* en el fondo heterólogo de *Arabidopsis*, también se realizaron análisis proteómicos utilizando electroforesis de doble dimensión y espectrometría de masas por MALDI-ToF (“Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight”). Al comparar los proteomas de las plantas silvestres con el de las transgénicas *35S-CpMYB10*, se detectaron algunos cambios. Varias proteínas aparecen *de novo*, aunque algunos de los cambios identificados corresponden a distintos niveles de expresión de ciertas proteínas. Algunas de estas proteínas (11) fueron identificadas utilizando espectrometría de masas, y varias de ellas corresponden a proteínas claramente relacionadas con respuestas a estrés (proteasa dependiente de ATP, factor transcripcional RAV2, anhidrasa carbónica, glutatión transferasa, ascorbato reductasa dependiente de GSH, chaperonina HSP60). Es probable que bajo otras condiciones de tratamiento se pudieran detectar otras proteínas. Además, se sabe que el uso de electroforesis bidimensional solo permite la visualización de proteínas con altos niveles de expresión, lo cual deja abierta la posibilidad de que otras proteínas de baja expresión no hayan sido detectadas en nuestros análisis. Sin embargo, es interesante que sin tratamiento con ABA las plantas sobreexpresoras de *CpMYB10* (*35S-CpMYB10*) presenten algunas proteínas que solo aparecen en las plantas control (*35S-NOS*) en respuesta a ABA (proteasa dependiente de ATP y peptidil isopropil isomerasa). Esto sugiere que la sobre-expresión de *CpMYB10* provoca la expresión de proteínas de respuesta a ABA.

Uniendo los resultados anteriormente expuestos, con los encontrados en los experimentos EMSA, se puede sugerir que esta actividad dual del FT *CpMYB10* (activador y represor) pudiera también presentarse en *Craterostigma*: *CpMYB10* funcionando como un represor en condiciones ambientales favorables, y como un activador en condiciones de sequía. Por ejemplo, es probable que bajo condiciones no estresantes, la proteína *CpMYB10* tuviera el papel de mantener apagada la expresión transcripcional de *CpMYB10* (y tal vez también de otros genes), pero que bajo condiciones de sequía, de alguna manera cambie el estatus de la proteína (ej. por fosforilación o defosforilación), liberando así el promotor de *CpMYB10* permitiendo su expresión y así cumpliendo posteriormente su papel como activador de genes de respuesta a estrés, como el de la LEA *Cp11-24*, y tal vez también, *CpMYB10* active a su propio promotor. Este mecanismo dual podría facilitar el rápido encendido y apagado de genes de respuesta a estrés abiótico (Fig. 23).

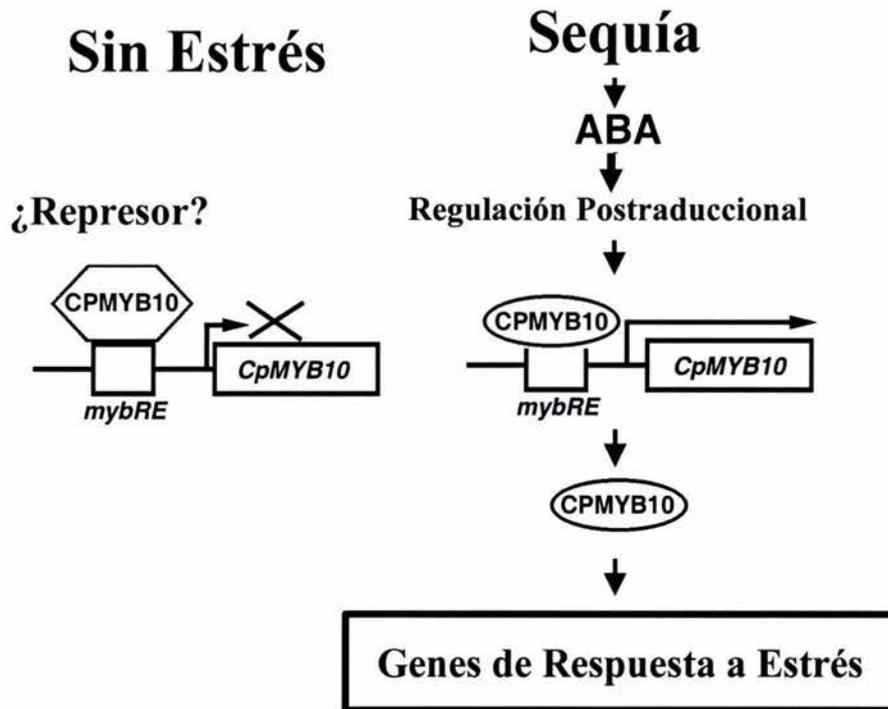


Figura 23. Modelo de acción propuesto para el factor transcripcional CpMYB10. CpMYB10 podría funcionar como un represor en condiciones ambientales favorables, y como un activador en condiciones de sequía. Por ejemplo, es probable que bajo condiciones no estresantes, la proteína CpMYB10 tuviera el papel de mantener apagada la expresión transcripcional de *CpMYB10* (y tal vez también de otros genes), pero que bajo condiciones de sequía, de alguna manera cambie el estatus de la proteína (ej. por fosforilación o defosforilación), liberando así el promotor de *CpMYB10* permitiendo su expresión y así cumpliendo posteriormente su papel como activador de genes de respuesta a estrés, como el de la LEA *Cp11-24*, y tal vez también, CpMYB10 active a su propio promotor. Este mecanismo dual podría facilitar el rápido encendido y apagado de genes de respuesta a estrés abiótico.

VII. CONCLUSIONES

- 1) La expresión de *CpMYB10* y *CpMYB5* esta regulada por ABA y deshidratación en hojas y tallos de *Craterostigma*, mientras que *CpMYB7* no responde a estos estímulos bajo las condiciones analizadas.
- 2) La expresión de *CpMYB10* en hojas de *Craterostigma* tratadas con ABA se presenta en células del parénquima y epidermis, mientras que *CpMYB5* se limita al parénquima. Además, en respuesta a ABA *CpMYB10* se expresa en los haces vasculares de raíces de *Craterostigma*, a diferencia de *CpMYB5* que se expresa en células del córtex.
- 3) La región corriente arriba del ATG de *CpMYB10* (1.5 Kb) regula la expresión del gen reportero GUS en respuesta a ABA y sequía; y 1 Kb de la región correspondiente a *CpMYB5* regula la expresión de GUS ante ABA y varios factores medioambientales.
- 4) La expresión de *CpMYB10* no requiere de síntesis de proteínas *de novo*.
- 5) La proteína CpMYB10 tiene la capacidad de unirse a DNA de manera específica en sitios de acción *in cis* tipo MYB presentes en su propio promotor y en el de la LEA *Cp11-24*.
- 6) La expresión ectópica de *CpMYB10* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* provoca una mayor abundancia del sistema radicular y fenotipos de tolerancia a estrés, hipersensibilidad a ABA, e insensibilidad a glucosa.
- 7) *CpMYB10* regula la expresión de genes de respuesta a estrés en el fondo genético de *Arabidopsis*.

VIII PERSPECTIVAS

- 1) Análisis comparativo de la regulación mediada por los promotores de *CpMYB10* y *CpMYB5* en *Arabidopsis*, y ensayar la posible inducción por otros tipos de estrés.
- 2) Expresar las construcciones P10-GUS y P5-GUS en varios fondos genéticos (mutantes *abi* y *aba*)
- 3) Mutagénesis de plantas que porten el promotor de *CpMYB10* (ó el de *CpMYB5*) fusionado a luciferasa, para aislar líneas no reguladas por ABA (identificación de reguladores de estos genes).
- 4) Analizar la respuesta adaptativa de las plantas transgénicas *35S-CpMYB10* ante otros estímulos medioambientales (frío, calor, etc.) aplicados de manera individual y combinándolos.
- 5) Realizar un análisis profundo de los genes regulados por *CpMYB10* en las plantas sobre-expresoras *35S-CpMYB10* mediante el uso de microarreglos de *Arabidopsis*.
- 6) Realizar un estudio más detallado del proteoma de las plantas sobre-expresoras de *CpMYB10*.
- 7) Mutagénesis de las plantas transgénicas sobre-expresoras de *CpMYB10* con el fin de aislar líneas mutantes sensibles a ABA (recuperación del fenotipo silvestre).
- 8) Analizar el efecto de la sobre-expresión de *CpMYB10* en cultivos de interés agrícola.

IX. BIBLIOGRAFIA

- Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., & Shinozaki, K. (1997). Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9: 1859-1868.
- Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki K. (2003). Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 63-78.
- Allan, A.C., Fricker, M.D., Warf, J.L., Beale, M.H., & Trewavas, A.J. (1994). Two transduction pathways mediate rapid effects on abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Cell* 6: 1319-1328.
- Alonso, J., Hirayama, T., Roman, G., Nourizadeh, S., & Ecker J. (1999). EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in Arabidopsis. *Science* 248: 2148-2152.
- Anderson, B.E., Ward, J.M., & Schroeder, J.I. (1994). Evidence for an extracellular reception site for abscisic acid in *Commelina* guard cells. *Plant Physiology* 104: 1177-1183.
- Arenas Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J., & León, P. (2000). Analysis of Arabidopsis glucose insensitive mutants, *gin5* and *gin6*, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes and Development* 14: 2085-2096.
- Arroyo, A., Bossi, F., Finkelstein, R.R., & León, P. (2003). Three genes that affect sugar sensing (Abscisic Acid Insensitive 4, Abscisic acid Insensitive 5, and Constitutive Triple Response 1) are differentially regulated by glucose in Arabidopsis. *Plant Physiology* 133: 231-242.
- Assmann, S.M., & Shimazaki, K.I. (1999). The multisensory guard cell: stomatal responses to blue light and abscisic acid. *Plant Physiology* 119: 809-815.
- Assmann, S.M. (2002). Heterotrimeric and unconventional GTP binding proteins in plant cell signaling. *Plant Cell* 14 (Supplement): S355-S373.
- Bartels, D., Schneider, K., Terstappen, G., Piatkowski, D., & Salamini, F. (1990). Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Planta* 181: 27-34.
- Bartels, D. & Salamini, F. (2001). Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Plant Physiology* 127: 1346-1353.
- Beaudoin, N., Serizet, C., Gosti, F., & Giraudat, J. (2000). Interactions between abscisic acid and ethylene signaling cascades. *Plant Cell* 12: 1103-1115.
- Bensmihen, S., To, A., Lambert, G., Kroj, T., Giraudat, J. & Parcy, F. (2004). Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic Arabidopsis seeds. *FEBS Letters*, 561: 127-131.
- Bernacchia, G., Salamini, F., & Bartels, D. (1996). Molecular Characterization of the Rehydration Process in the Resurrection Plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Physiology* 111: 1043-1050.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E., & Jensen, R.G. (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7: 1099-1111.
- Bohnert, H.J. & Jensen, R.G. (1996). Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends in Biotechnology* 14: 89-87.
- Bouquin, T., Meier, C., Foster, F., Nielsen, ME., & Mundy, J. (2001). Control of specific gene expression by gibberellin and brassinosteroid. *Plant Physiology* 127: 450-458.
- Boyer, J.S. (1982). Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448.
- Bray, E.A. (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* 103: 1035-1040.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., & Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. En: "Biochemistry and Molecular Biology of Plants". Gruissem, W., Buchanan, B., Jones, R. (eds). American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD; 1158-1249.
- Chandock, M.R., Ytterberg, A.J., van Wijk, K.J., & Klessig, D.F. (2003). The pathogen-inducible nitric oxid synthase (iNOS) in plants is a variant of the P protein of the glycine decarboxylase complex. *Cell* 113: 469-482.

- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J. & Kim, S. (2000). ABFs: a family of ABA-responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry* 275: 1723-1730.
- Chory, J., & Wu, D. (2001). Weaving the complex web of signal transduction. *Plant Physiology* 125: 77-80.
- Coursol, S., Fan, L.M., Le, Stunff, H., Spiegel, S., Gilroy, S., & Assmann, S.M. (2003). Sphingolipid signaling in Arabidopsis guard cells involves heterotrimeric G proteins. *Nature* 423: 651-654.
- Cutler, A. & Krochko, J. (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science* 4: 472-478.
- Cutler, S., Ghassemian, M., Bonetta, D., Cooney, S., & McCourt, P. (1996). A protein farnesyl transferase involved in abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Science* 273: 1239-1241.
- Delseny, M., Bies-Etheve, N., Carles, C., Hull, G., Vicent, C., Raynal, M., Grellet, F., & Aspart, L. (2001). Late Embryogenesis Abundant (LEA) protein regulation during Arabidopsis seed maturation. *Journal of Plant Physiology* 158: 419-427.
- Desikan, R., Griffiths, R., Hancock, J., and Neill, S. (2002). A new role for an old enzyme: nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal closure in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 99: 16314-16318.
- Dias, A.P., Braun, E.L., McMullen, M.D., & Grotewold, E. (2003). Recently duplicated maize R2R3 Myb genes provide evidence for distinct mechanisms of evolutionary divergence after duplication. *Plant Physiology* 131: 610-620.
- Ephritikhine, G., Fellner, M., Vannini, C., Lalous, D., & Barbier-Brygoo, H. (1999). The sax1 dwarf mutant of *Arabidopsis thaliana* shows altered sensitivity of growth responses to abscisic acid, auxin, gibberellins and ethylene and is partially rescued by exogenous brassinosteroid. *Plant Journal* 18: 303-314.
- Franke, W., Phillips, J., Salamini, F., & Bartels, D. (1998). Two dehydration-inducible transcripts from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* encode interacting homeodomain-leucine zipper proteins. *Plant Journal* 15: 413-421.
- Finkelstein, R.R. (1994). Mutations at two new Arabidopsis ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant Journal* 5: 765-771.
- Finkelstein, R. & Lynch, T. (2000). The Arabidopsis abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12: 599-609.
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L., & Rock, C.D. (2002). Abscisic acid signalling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14 (Supplement): S15-S45.
- Finkelstein, R.R., & Rock, C.D. (2002). Abscisic acid biosynthesis and response. En: "The Arabidopsis Book". Somerville, C.R. and Meyerowitz, E.M., eds (American Society of Plant Biologist, Rockville, M.D. doi/10.1199/tab.0058, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>).
- Foster, R., & Chua, N.H. (1999). An Arabidopsis mutant with deregulated ABA gene expression: Implications for negative regulator function. *Plant Journal* 17: 363-372.
- Fu, Y., Li, H., & Yang, Z. (2002). The ROP2 GTPase controls the formation of cortical fine F-actin and the early phase of directional cell expansion during Arabidopsis organogenesis. *Plant Cell* 14: 777-794.
- Fujimoto, S.Y., Ohta, M., Usui, A., Shinshi, H., & Ohme-Takagi, M. (2000). Arabidopsis ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell* 12: 393-404.
- Furini, A., Koncz, C., Salamini, F., & Bartels, D. (1994). Agrobacterium-mediated transformation of the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell Reports* 14:102-106.
- Furini, A., Koncz, C., Salamini, F., & Bartels, D. (1997). High level transcription of a member of a repeated gene family confers dehydration tolerance to callus tissue of *Craterostigma plantagineum*. *EMBO Journal* 16: 3599-3608.
- Gaff, D.F. (1971). Desiccation-tolerant flowering plants in Southern Africa. *Science* 174: 1033-1034.
- García-Mata, C., & Lamattina, L. (2002). Nitric oxide and abscisic acid cross talk in guard cells. *Plant Physiology* 128: 790-792.
- Ghassemian, M., Nambara, E., Cutler, S., Kawaide, H., Kamiya, Y., & McCourt, P. (2000). Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 12: 1117-1126.
- Gilroy, S., Read, N.D., & Trewavas, A.J. (1990). Elevation of cytoplasmic calcium by caged calcium or caged

- inositol triphosphate initiates stomatal closure. *Nature* 343: 769-771.
- Gilroy, S., & Jones, R. (1994). Gibberellic acid and abscisic acid coordinately regulate cytoplasmic calcium and secretory activity in barley aleurone protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 89: 3591-3595.
- Giraudat, J., Hauge, B.M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F., & Goodman, H.M. (1992). Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* 4: 1251-1261.
- Giraudat, J., Parcy, F., Bertauche, N., Gosti, F., Leung, J., Morris, P.C., Bouvier-Durant, M., & Vartanian N. (1994). Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Molecular Biology* 26: 1557-1577.
- Giraudat, J. (1995). Abscisic acid signalling. *Current Opinion in Cell Biology* 7: 232-238.
- Goff, S.A., Cone, K.C., & Chandler V.L. (1992). Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes & Development* 6: 864-875.
- González-Gusmán, M., Apostolova, N., Bellés, J.M., Barrero, J.M., Piqueras, P., Ponce, M.R., Micol, J.L., Serrano, R., and Rodríguez, P.L. (2002). The short chain alcohol dehydrogenase ABA2 catalyzes the conversion of xanthoxin into abscisic aldehyde. *Plant Cell* 14: 1833-1846.
- Grotewold, E., Drummond, B.J., Bowen, B., & Peterson, T. (1994). The Myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell* 76: 543-553.
- Guiltinan, M., Marcotte, Jr. W., & Quatrano, R.S. (1990). A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* 250: 267-271.
- Hakeda-Susuki, S., Ng, J., Tzu, J., Dietzl, G., Sun, Y., Harás, M., Nardine, T., Luo, L., & Dickson B.J. (2002). Rac function and regulation during Drosophila development. *Nature* 416: 438-442.
- Hamilton, D.W.A., Hills, A., Kohler, B., & Blatt M.R. (2000). Ca²⁺ channels at the plasma membrane of stomatal guard cells are activated by hyperpolarization and abscisic acid. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 97: 4967-4972.
- Herschman, H.R. (1991). Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annual Review in Biochemistry* 60: 281-319.
- Himmelbach, A., Iten, M., & Grill E. (1998). Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Philosophical Transactions Royal Society London Biological Sciences* 353: 1439-1444.
- Himmelbach, A., Yang, Y., & Grill, E. (2003). Relay and control of abscisic acid signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 470-479.
- Hobo, T., Kowyama, Y. & Hattori, T. (1999). A bZIP factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96: 15348-15353.
- Hocking, T., Clapham, J., & Cattell, K.J. (1978). Abscisic acid binding to subcellular fractions from leaves of Vicia faba. *Planta* 138: 303-304.
- Hoeren, F.U., Dolferus, R., Wu, Y., Peacock, W.J., & Dennis E.S. (1998). Evidence for a role for AtMYB2 in the induction of the Arabidopsis alcohol dehydrogenase gene (ADH1) by low oxygen. *Genetics* 149: 479-490.
- Hornberg, C., & Weiler E. (1984). High-affinity binding sites for abscisic acid on plasmalemma of Vicia faba guard cells. *Nature* 310: 321-324.
- Huijser, C., Kortstee, A., Pego, J., Weisbeek, P., Wisman, E., & Smeekens, S. (2000). The Arabidopsis SUCROSE UNCOUPLED-6 gene is identical to ABSCISIC ACID INSENSITIVE-4: Involvement of abscisic acid in sugar responses. *Plant Journal* 23: 577-585.
- Hunt, L., Mills, L.N., Pical, C., Leckie, C.P., Aitken, F.L., Kopka, J., Mueller-Roeber, B., McAinsh, M.R., Hetherington, A.M., & Gray, J.E. (2003). Phospholipase C is required for the control of stomatal aperture by ABA. *Plant Journal* 34: 47-55.
- Ichimura, K., Mizoguchi, T., Yoshida, R., Yuasa, T., & Shinozaki, K. (2000). Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 y ATMPK6. *Plant Journal* 24: 655-665.
- Ingram, J. & Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review in Plant Physiology & Plant Molecular Biology* 47: 377-403.
- Ishitani, M., Xiong, L., Stevenson, B., & Zhu, J.K. (1997). Genetic analysis of osmotic and cold stress signal transduction in Arabidopsis: Interactions and convergence of abscisic acid-dependent and abscisic

- acid-independent pathways. *Plant Cell* 9: 1935-1949.
- Iturriaga, G., Leyns, L., Villegas, A., Gharaibeh, R., Salamini, F., & Bartels, D. (1996). A family of novel myb-related genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* are specifically expressed in callus and roots in response to ABA or desiccation. *Plant Molecular Biology* 32: 707-716.
- Jiang, C., Gu, J., Chopra, S., Gu, X., & Peterson T. (2004). Ordered origin of the typical two- and three-repeat Myb genes. *Gene* 326: 13-22.
- Jin, H., & Martin, C. (1999). Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Molecular Biology*. 41: 577-585.
- Jeannette, E., Rona, J.P., Bardat, F., Cornel, D., Sotta, B., & Miginiac, E. (1999). Induction of RAB18 gene expression and activation of K⁺ outward rectifying channels depend on extracellular perception of ABA in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Plant Journal* 18: 13-22.
- Jofuku, K.D., den Boer, B.G., Van Montagu, M., & Okamoto, J.K. (1994). Control of *Arabidopsis* flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell* 6: 1211-1225.
- Johnson, R.R., Wagner, R.L., Verhey, S.D., & Walker-Simmons, M.K. The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiology* 130: 837-846.
- Jones, M.A., Shen, J.J., Fu, Y., Li, L., Yang, Z., & Grierson, C.S. (2002). The *Arabidopsis* Rop GTPase is a positive regulator of both root-hair initiation and tip growth. *Plant Cell* 14: 763-776.
- Kao, C.Y., Cocciolone, S.M., Vasil, I.K., & McCarty, D.R. (1996). Localization and interaction of the cis-acting elements for abscisic acid, VIVIPAROUS 1, and light activation of the C1 gene of maize. *Plant Cell* 8: 1171-1179.
- Kim, B.T., Min, Y.K., Asami, T., Park, N.K., Kwon, O.Y., Cho, K.Y., & Yoshida, S. (1999). 2-Fluoroabscisic acid analogs: Their synthesis and biological activities. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 47:313-317.
- Kinter, M. & Sherman, N.E. (2000). "Protein sequencing and identification using tandem mass spectrometry". Wiley-Interscience Series on Mass Spectrometry. Dominic, M. Desiderio & Nico M.M. Nibbering, Series Editors, New York, USA.
- Klempnauer, K.H., Gonda, T.J., & Bishop, J.M. (1982). Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene *v-myb* and its cellular progenitor *c-myb*: the architecture of a transduced oncogene. *Cell* 31: 453-463.
- Koornneef, M., Reuling, G., & Karssen, C.M. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 61: 377-383.
- Koshiba, T., Ballas, N., Wong, L.M., & Theologis, A. (1995). Transcriptional regulation of *PS-IAA4/5* and *PS-IAA6* gene expression by indole-acetic acid and protein synthesis inhibitors in pea (*Pisum sativum*). *Journal of Molecular Biology* 253: 396-413.
- Kranz, H.D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R.C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, C., Smeeckens, S., Tonelli, C., Paz-Ares, J., & Weisshaar, B. (1998). Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16: 263-276.
- Kwak, J.M., Mori, I.C., Pei, Z.M., Leonhardt, N., Torres, M.A., Dangel, J.L., Bloom, R.E., Bodde, S., Jones, J.D., & Schroeder, J.I. (2003). NADPH oxidase *AtbohD* and *AtbohF* genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO Journal* 22: 2623-2633.
- Laby, R., Kincaid, M., Kim, D., & Gibson, S. (2000). The *Arabidopsis* sugar-insensitive mutants *sis4* and *sis5* are defective in abscisic acid synthesis and response. *Plant Journal* 23: 587-596.
- Laskowski, M., Dreher, K.A., Gehring, M.A., Abel, S., Gensler, A.L., & Sussex, I.M. (2002). FQRI, a novel primary auxin-response gene, encodes a flavin mononucleotide-binding quinone reductase. *Plant Physiology* 128: 578-590.
- Lee, H., Xiong, L., Gong, Z., Ishitani, M., Stevenson, B., and Zhu, J.K. (2001). The *Arabidopsis* HOS1 gene negatively regulates cold signal transduction and encodes a ring finger protein that displays cold-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning. *Genes & Development* 15: 912-924.
- Lee, S., Choi, H., Suh, S., Doo, I.S., Oh, K.Y., Choi, E.J., Schroeder-Taylor, A.T., Low, P.S., & Lee, Y. (1999). Oligogalacturonid acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen

- species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiology* 121: 147-152.
- Lemichez, E., Wu, Y., Sanchez, J.P., Mettouchi, A., Mathur, J., & Chua, N.H. (2001). Inactivation of AtRAC1 by abscisic acid is essential for stomatal closure. *Genes and Development* 15: 1808-1816.
- Lemtiri-Chlieh, F., MacRobbie, E.A.C., & Brearley, C.A. (2000). Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating the K⁺-inward rectifying conductance in guard cells. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 97: 8687-8692.
- Leung, J., Bouvier-Durand, M., Morris, P.C., Guerrier, D., Chefdor, F., & Giraudat, J. (1994). *Arabidopsis* ABA response gene *ABI1*: features of a calcium-modulated protein phosphatase. *Science* 264: 1448-1452.
- Leung, J., Merlot, S., & Giraudat, J. (1997). The *Arabidopsis* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 2 (*ABI2*) and *ABI1* genes encode redundant protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell* 9: 759-771.
- Li, H., Shen, J.J., Zheng, Z.L., Lin, Y.K., & Yang, Z.B. (2001). The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126: 670-684.
- Li, J., Wang, X.Q., Watson, M.B., & Assmann, S.M. (2000). Regulation of abscisic acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* 287: 300-303.
- Lipsick, J.S. (1996). One billion years of Myb. *Oncogene* 13: 223-235.
- Liu, Q., Kasuga, M., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391-1406.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., McLachlin, D., Chait, B.T., & Chua, N.H. (2002). *ABI5* acts downstream of *ABI3* to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant Journal* 32: 317-328.
- MacRobbie, E.A.C. (1995a). Effects of ABA on 86Rb⁺ fluxes at plasmalemma and tonoplast of stomatal guard cells. *Plant Journal* 7: 835-843.
- MacRobbie, E.A.C. (1995b). ABA induced ion efflux in stomatal guard cells: multiple actions of ABA inside and outside the cell. *Plant Journal* 7: 565-576.
- Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Huguency, P., Frey, A., & Marion-Poll, A. (1996). Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO Journal* 15: 2331-23342.
- Martin, C., & Paz-Ares, J. (1997). MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics* 13: 67-73.
- McCarty, D.R., Hattori, T., Carson, C.B., Vasil, V., Lazar, M., & Vasil, I.K. (1991). The viviparous 1 developmental gene of maize encodes a novel transcription activator. *Cell* 66: 895-905.
- McCue, K.F. & Hanson, A.D. (1990). Drought and salt tolerance towards understanding and application. *Trends in Biotechnology* 8: 358-362.
- Meinhard, M., Rodriguez, P.L., & Grill, E. (2002). The sensitivity of *ABI2* to hydrogen peroxide links the abscisic acid-response regulator to redox signaling. *Planta* 214: 775-782.
- Meinke, D.W., Franzmann, L.H., Nickle, T.C., & Yeoung, E.C. (1994). Leafy cotyledon mutants of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 6: 1049-1064.
- Merlot, S., François, G., Guerrier, D., Vavasseur, A. & Giraudat, J. (2001). The *ABI1* and *ABI2* protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signaling pathway. *Plant Journal* 25: 295-303.
- Molendijk, A.J., Bischoff, F., Rajendrakumar, C.S.V., Friml, J., Braun, M., Gilroy, S., & Palme, K. (2001). *Arabidopsis thaliana* Rop GTPase are localized to tips of root hairs and control polar growth. *EMBO Journal* 20: 2779-2788.
- Molina, J. (1979). "Recursos agrícolas de zonas áridas y semiáridas de México". Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- Mustilli, A.C., Merlot, S., Vavasseur, A., Frenzi, F., & Giraudat, J. (2002). *Arabidopsis* OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14: 3089-3099.

- Nakagawa, H., Ohmiya, K. & Hattori, T. (1996). A rice bZIP protein, designated OSBZ8, is rapidly induced by abscisic acid. *Plant Journal* 9: 217-227.
- Nantel, A. & Quatrano, R.S. (1996). Characterization of three basic leucine zipper factors, including two inhibitors of EmBP-1 DNA binding activity. *Journal of Biological Chemistry* 271: 31296-31305.
- Neill, S.J., Desikan, R., Clarke, A., & Hancock, J.Y. (2002). Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signalin in stonatal guard cells. *Plant Physiology* 128: 13-16.
- Ng, C.K.Y., Carr, K., McAinsh, M.R., Powell, B., & Hetherington, A.M. (2001). Drought-induced guard cell signal transduction involves sphingosine-1-phosphate. *Nature* 410: 596-599.
- Oeda, K., Salinas J. & Chua, NH (1991). A tobacco bZIP transcription activator (TAF-1) binds to a G-box like motif conserved in plant genes. *EMBO Journal* 10: 1793-1802.
- Oppenheimer, D.G., Herman, P.L., Sivakumaran, S., Esch, J., & Marks, M.D. (1991). A myb gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules. *Cell* 67: 483-493.
- Pedron, J., Brault, M., Nake, C., & Miginiac, E. (1998). Detection of abscisic-acid-binding proteins in the microsomal protein fraction of *Arabidopsis thaliana* with abscisic-acid-protein conjugates used as affinity probes. *European Journal of Biochemistry* 252: 385-390.
- Piatkowski, D., Schneider, K., Salamini, F., & Bartels, D. (1990). Characterization of five abscisic acid-responsive cDNA clones isolated from the desiccation-tolerant plant *Cratogeomys plantagineum* and their relationship to other water-stressed genes. *Plant Physiology* 94: 1682-1688.
- Porembski, S. & Barthlott, W. (2000). Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. *Plant Ecology* 151: 19-28.
- Quesada, V., Ponce, M., & Micol, J. (2000). Genetic analysis of salt-tolerant mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 154: 421-436.
- Rabinowicz, P.D., Braun, E.L., Wolfe, A.D., Bowen, B., & Grotewold, E. (1999). Maize R2R3 Myb genes: sequence analysis reveals amplification in the higher plants. *Genetics* 153: 427-444.
- Raskin, I., & Ladyman, J. (1988). Isolation and characterization of a barley mutant with abscisic-acid-insensitive stomata. *Planta* 173: 73-78.
- Razem, F.A., Luo, M., Liu, J.H., Abrams, S.R., & Hill, R.D. (2004). Purification and Characterization of a Barley Aleurone Abscisic Acid-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* 279: 9922-9929.
- Reichmann, J.L., & Ratcliffe, O.J. (2000). A genomic perspective of plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 423-434.
- Robertson, D. (1955). The genetics of vivipary in maize. *Genetics* 40: 745-760.
- Rook, F., Corke, F., Card, R., Munz, G., Smith, C., & Bevan, M.W. (2001). Impaired sucrose-induction mutants reveal the modulation of sugar-induced starch biosynthetic gene expression by abscisic acid signaling. *Plant Journal* 26: 421-433.
- Rook, C. (2000). Pathways to abscisic acid-regulated gene expression. *New Phytologist* 148: 357-396.
- Rosinski, J.A., & Atchler, W.R. (1998). Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin. *Journal of Molecular Evolution* 46: 74-83.
- Sanchez, J.P., & Chua, N.H. (2001). *Arabidopsis* PLC1 is required for secondary responses to abscisic acid signals. *Plant Cell* 13: 1143-1154.
- Schultz, T.F., & Quatrano, R.S. (1997). Evidence for surface perception of abscisic acid by rice suspension cells as assayed by Em gene expression. *Plant Science* 130: 63-71.
- Schwartz, A., Wu, W.H., Tucker, E.B., & Assmann, S.M. (1994). Inhibition of inward K⁺ channels and stomatal response by abscisic acid: an intracellular locus of phytohormone action. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91: 4019-4023.
- Schwartz, S.H., Léon-Kloosterziel, K.M., Koornneef, M., & Zeevaart, J.A.D. (a). (1997). Biochemical characterization of the aba2 and aba3 mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* 114: 161-166.
- Schwartz, S.H., Tan, B.C., Gage, D.A., Zeevaart, J.A.D., & McCarty, D.R. (b). (1997). Specific oxidative cleavage of carotenoids by VP14 of maize. *Science* 276: 1872-1874.

- Schwartz, S.H., Xiaoqiong, Q., & Zeevaart, J.A.D. (2003). Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiology* 131: 1591-1601.
- Shen, Q., & Ho, T.H.D. (1995). Functional dissection of an abscisic acid (ABA)-inducible gene reveals two independent ABA-responsive complexes each containing a G-box and a novel cis-acting element. *Plant Cell* 7: 295-307.
- Sheen, J. (1996). Ca²⁺-dependent protein kinases and stress signal transduction in plants. *Science* 274: 1900-1902.
- Smeekens, S. (2000). Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review in Plant Physiology & Plant Molecular Biology* 51: 49-81.
- Söderman, E., Mattson, J., & Engström, P. (1996). The *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-7* is induced by water deficit and by abscisic acid. *Plant Journal* 10: 375-381.
- Steber, C.M., Cooney, S.E., & McCourt, P. (1998). Isolation of the GA-response mutant *sly1* as a suppressor of *ABI1-1* in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 149: 509-521.
- Stracke, R., Werber, M., & Weisshaar, B. (2001). The *R2R3-MYB* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 447-456.
- Sturaro, M., Vernieri, P., Castiglioni, P., Binelli, G., & Gavazzi, G. (1996). The *rea* (red embryonic axis) phenotype describes a new mutation affecting the response of maize embryos to abscisic acid and osmotic stress. *Journal of Experimental Botany* 47: 755-762.
- Susuki, M., Kao, C.Y., & McCarty, D.R. (1997). The conserved B3 domain of *VIVIPAROUS 1* has a cooperative DNA binding activity. *Plant Cell* 9: 799-807.
- Tahtiharju, S., & Palva, T. (2001). Antisense inhibition of protein phosphatase 2C accelerates cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 26: 461-470.
- Thompson, M.A. & Ramsay, R.G. (1995). Myb: an old oncoprotein with new roles. *BioEssays* 17: 341-350.
- Ullah, H., Chen, J.G., Young, J., Im, K.H., Sussman, M., & Jones, A. (2001). Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in *Arabidopsis*. *Science* 292: 2066-2069.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. & 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. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 97: 11632-11637.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S., & Shinozaki, K. (1993). An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved Myb recognition sequence. *Plant Cell* 5: 1529-1539.
- Urao, T., Noji, M-a., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1996). A transcriptional activation domain of *ATMYB2*, a drought-inducible *Arabidopsis* Myb-related protein. *Plant Journal* 10: 1145-1148.
- Villalobos, M.A., Bartels, D., & Iturriaga, G. (2004). Stress tolerance and glucose insensitive phenotypes in *Arabidopsis* overexpressing the *CpMYB10* transcription factor gene. *Plant Physiology* 135: 309-324.
- Walker-Simmons, M.K., Holappa, L.D., Abrams, G.D., & Abrams, S.R. (1997). ABA metabolites induce group 3 LEA mRNA and inhibit germination in wheat. *Physiologia plantarum* 100: 474-480.
- Wang, X.Q., Ullah, H., Jones, A., & Assmann, S. (2001). G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* 292: 2070-2072.
- Wilson, A., Pickett, F., Turner, J., & Estelle, M. (1990). A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Molecular & General Genetics* 222: 377-383.
- Wood, A.J. & Oliver, M.J. (1999). Translational control in plant stress: the formation of messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) in response to desiccation of *Tortula ruralis* gametophytes. *Plant Journal* 18: 359-370.
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., & Zhu, JK. (2001a) The *Arabidopsis* *LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulforase and modulates a cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* 13: 2063-2083.
- Xiong, L., & Zhu, J.K. (2001b). Abiotic stress signal transduction on plants: Molecular and genetic perspectives. *Physiologia Plantarum* 112: 152-166.
- Xiong, L., Ishitani, M., Lee, H., Zhang, C., & Zhu, J.K. (2001c). *FIERY1* encoding an inositol poluphosphate 1-

- phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in *Arabidopsis*. *Genes and Development* 15: 1971-1984.
- Xoconostle-Cázares, B., Xinag, Y., Ruiz-Medrano, R., Wang, H.L., Yoo, B.C., McFarland, K.C., Franceschi, V.R., & Lucas, W.J. (1999). Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* 283: 94-98.
- Yang, Z. (2002). Small GTPases: Versatile signaling switches in plants. *Plant Cell* 14 (Supplement): S375-S388.
- Yamazaki, D., Yoshida, S., Asami, T., & Kuchitsu, K. (2003). Visualization of abscisic acid-perception sites on the plasma membrane of stomatal guard cells. *Plant Journal* 35: 119-139.
- Yu, E.Y., Kim, S.E., Kim, J.H., Ko, J.H., Cho, M.H., & Chung, I.K. (2000). Sequence-specific DNA recognition by the Myb-like domain of plant telomeric protein RTBP1. *Journal of Biological Chemistry* 275: 24208-24214.
- Zeevaart, J.A.D. & Creelman, R.A. (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology* 39: 439-473.
- Zhang, D.P. Chen, S.W., Peng, Y.B., & Shen, Y.Y. (2001). Abscisic acid-specific binding sites in the flesh of developing apple fruit. *Journal of Experimental Botany* 52: 2097-2103.
- Zhang, D.P., Wu, Z.Y., Li, X.Y., & Zhao, Z.X. (2002). Purification and identification of a 42-kilodalton abscisic acid-specific-binding protein from epidermis of broad bean leaves. *Plant Physiology* 128: 714-725.
- Zhang, J., Schurr, U., & Davies, W.J. (1987). Control of stomatal behaviour by abscisic acid which apparently originates in rosettes. *Journal of Experimental Botany* 38: 1174-1181.
- Zheng, Z.L., Nafisi, M., Tam, A., Li, H., Crowell, D.N., Chary, S.N., Schroeder, J.I., Shen, J., & Yang, Z. (2002). Plasma membrane-associated ROP10 small GTPase is a specific negative regulator of Abscisic Acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 2787-2797.
- Zhu, J. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review in Plant Biology* 53: 247-273.