

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

ANÁLISIS FUNCIONAL DE LA FAMILIA DE HIDROFILINAS LEA4 EN *Arabidopsis thaliana*

Tesis que para obtener el grado de Maestra en Ciencias Bioquímicas

presenta

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Yadira Olvera Carrillo

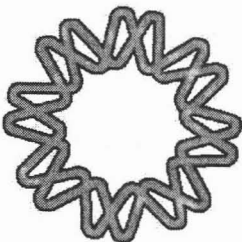
FECHA: 04 FEBRERO 2005

FIRMA: [Firma]

Biól. Yadira Olvera Carrillo

Directora de tesis:

Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles



Febrero 2005

m. 340888



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del comité tutorial, por sus críticas positivas durante el desarrollo de este trabajo de tesis y su paciencia en los exámenes tutorales,

Dra. Susana López Charretón
Dra. Patricia León Mejía
Dra. Alejandra A. Covarrubias Robles

A los miembros del jurado del examen para la obtención del grado, por sus valiosos comentarios y correcciones en el manuscrito de la tesis,

PRESIDENTE	Dra. Gladys Iliana Cassab López
SECRETARIO	Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles
VOCAL	Dra. Martha Patricia Coello Cutiño
SUPLENTE	Dr. Ángel Arturo Guevara García
SUPLENTE	Dr. Mario Rocha Sosa

Al Dr. Francisco Campos por facilitarme los anticuerpos para la proteína AtLEA4-5 y la cepa de *E. coli* transformada con el plásmido PTRc99A que lleva insertada la secuencia codificante para la misma proteína, con la cual pude obtener la proteína recombinante.

A la L. en C. (Bioquím.) Rosa Estela Quiroz por facilitarme las semillas (T_0) de *Arabidopsis* para seleccionar las plantas transformadas con la construcción para sobre-expresar el gen AtLEA4-5.

A la M. en C. Sonia Cuéllar por su asesoría en el análisis estadístico de los resultados obtenidos con los experimentos de sequía con plantas transgénicas.

A todos mis compañeros del laboratorio, Sonia, Caty, Erika, Erickita, Marina, Rosa Estela, Rosy, Marina, Pepe, Pancho, José Luis, Chuy, por los momentos agradables y también los momentos difíciles que hemos pasado juntos, así como por su disposición a ayudarme en el trabajo experimental.

A mi familia y mis amigos por darme ánimos siempre para continuar en el camino de la investigación, por compartir conmigo momentos muy felices y apoyarme en momentos tristes y difíciles.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme la Beca de nivel Maestría (No. de Registro 169924) y al Sistema Nacional de Investigadores (SNI) por otorgarme el apoyo para Ayudante de Investigador (Clave SNI 1284).

Esta tesis de Maestría se llevó a cabo dentro del Programa de Posgrado en Ciencias Bioquímicas en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología, UNAM, bajo la asesoría directa de la Dra. Alejandra Covarrubias Robles.

ÍNDICE

RESÚMEN	1
INTRODUCCIÓN	
I. El déficit hídrico y su efecto en las plantas	3
II. Mecanismos involucrados en la respuesta al déficit hídrico	5
II.1 Ajuste osmótico y osmoprotección	
II.2 Compartimentación de iones	
II.3 Estrés oxidativo	
II.4 Facilitamiento del flujo de agua	
II.5 Transferasas de lípidos	
II.6 Protección de organelos involucrados en la fotosíntesis	
II.7 Degradación y reparación de proteínas	
II.8 Modificaciones de la pared celular	
II.9 Proteínas protectoras de la maquinaria celular	
III. Regulación de la expresión genética en respuesta a déficit hídrico	12
III.1 <u>Percepción del estrés</u>	
III.2 <u>Transducción de la señal</u>	
III.3 <u>Activación transcripcional de genes</u>	
IV. Proteínas de embriogénesis tardía	22
IV.1 <u>Sobre-expresión de genes que codifican para proteínas tipo LEA</u>	
IV.2 <u>Análisis funcional de hidrofilinas en experimentos <i>in vitro</i></u>	
V. La interferencia de RNA (RNAi) como mecanismo de silenciamiento de genes	28
ANTECEDENTES	30
HIPÓTESIS	32
OBJETIVO GENERAL	32
OBJETIVOS PARTICULARES	32
MATERIALES Y MÉTODOS	
I. Análisis bioinformático de la familia de proteínas LEA4: clasificación, motivos conservados y predicción de estructura secundaria	33
II. Material vegetal y condiciones de crecimiento	34
III. Crecimiento de plantas silvestres y colecta de silicuas para el análisis de los patrones de acumulación de transcritos de la familia <i>AtLEA4</i> y la proteína <i>AtLEA4-5</i> durante la embriogénesis	34
IV. Tratamientos de estrés abiótico en plantas de 2 semanas y plantas adultas de 6 a 7 semanas de crecimiento	35
V. Aislamiento y obtención de sondas correspondientes a los genes <i>AtLEA4-1</i>	

y <i>AtLEA4-2</i>	37
VI. Extracción de RNA y experimentos tipo Northern (hibridación DNA-RNA) y RT-PCR	38
VII. Caracterización de los patrones de acumulación de los transcritos de la familia <i>AtLEA4</i> durante la embriogénesis y en respuesta a déficit hídrico	
VIII. Extracción de proteína y experimentos tipo Western (interacción proteína-anticuerpo)	41
IX. Caracterización de los patrones de acumulación de la proteína <i>AtLEA4-5</i> durante la embriogénesis y en respuesta a déficit hídrico	42
X. Sobre-expresión del gen <i>AtLEA4-5</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	44
X.1 <u>Experimentos de germinación en presencia de estrés</u>	
X.2 <u>Análisis fenotípico de plantas adultas (6-7 semanas) sometidas a sequía</u>	
X.3 <u>Análisis estadístico</u>	
XI. Silenciamiento del gen <i>AtLEA4-5</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	46
RESULTADOS	
I. Análisis bioinformático de la familia de proteínas LEA4: clasificación, motivos conservados y predicción de estructura secundaria	48
II. Caracterización de los patrones de acumulación de los transcritos de la familia <i>AtLEA4</i> durante la embriogénesis y en respuesta a déficit hídrico	52
III. Caracterización de los patrones de acumulación de la proteína <i>AtLEA4-5</i> durante la embriogénesis y en respuesta a déficit hídrico	56
IV. Sobre-expresión del gen <i>AtLEA4-5</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	60
IV.1 <u>Experimentos de germinación en condiciones de estrés</u>	
IV.2 <u>Análisis fenotípico de plantas adultas (6-7 semanas) en sequía</u>	
V. Silenciamiento del gen <i>AtLEA4-5</i> en <i>Arabidopsis thaliana</i>	65
DISCUSIÓN	
I. Características estructurales de hidrofilinas de la familia <i>AtLEA4</i>	68
III. Patrones de acumulación de transcritos de la familia <i>AtLEA4</i> y la proteína <i>AtLEA4-5</i> durante la embriogénesis y en respuesta a estrés	71
IV. La proteína <i>AtLEA4-5</i> participa en la respuesta adaptativa de la planta al déficit hídrico en <i>Arabidopsis</i>	75
METAS ALCANZADAS	78
CONCLUSIONES	79
PERSPECTIVAS	80
REFERENCIAS	81

RESÚMEN

Las plantas están sujetas a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico durante su ciclo de vida. Uno de los tipos de estrés abiótico más comunes es el déficit hídrico, que puede estar representado por sequía, temperaturas bajas y alta salinidad. En las plantas se han seleccionado diversos mecanismos para evitar o tolerar el déficit hídrico, desde adaptaciones morfológicas y fisiológicas, hasta cambios en la expresión genética. Una de las modificaciones en la expresión genética se refiere a la síntesis de moléculas protectoras de la maquinaria celular, como es el caso de las proteínas LEA (por Late Embryogenesis Abundant) que se expresan de manera abundante en tejidos vegetativos sujetos a déficit hídrico, así como en la última etapa de desarrollo de las semillas, al inicio de su desecación. Debido a que estas proteínas, al igual que otras proteínas de animales, levaduras y bacterias, tienen una composición de aminoácidos con un elevado porcentaje de glicinas y un alto índice de hidrofiliidad, se ha propuesto denominarlas hidrofilinas. Se han realizado estudios de sobre-expresión de algunas hidrofilinas en plantas y levaduras, dando como resultado fenotipos de tolerancia ante situaciones que provocan un déficit hídrico. Hasta la fecha se carece de estudios funcionales que indiquen claramente cuál es el mecanismo de acción de estas proteínas o cuáles son sus moléculas blanco. En este trabajo se planteó el objetivo de profundizar en el conocimiento del papel de estas proteínas en la respuesta adaptativa al déficit hídrico, utilizando como modelo de estudio a la familia de hidrofilinas LEA4 de *Arabidopsis thaliana*. Como primer punto se llevó a cabo un análisis bioinformático para identificar el número de miembros que conforman a esta familia en la planta bajo estudio. Simultáneamente, se buscaron secuencias reportadas en los bancos de secuencias de expresión (por EST/Expression Sequences Tagging) para identificar los cDNAs correspondientes a proteínas LEA4 de otras especies vegetales, incluyendo gimnospermas y angiospermas. Se identificaron motivos conservados en estas proteínas y se construyó un árbol filogenético con las mismas.

Por otra parte, se caracterizaron los patrones de acumulación de los transcritos de la familia *AtLEA4* y los de una de las proteínas de la familia, codificada por el gen *AtLEA4-5*. Estos patrones se analizaron durante la embriogénesis de la semilla, así como en respuesta a estrés osmótico, alta salinidad y temperaturas bajas en plantas

de dos semanas de edad. También se llevaron a cabo experimentos de sequía con plantas adultas, a las cuales se les dejó de aplicar riego durante dos semanas hasta alcanzar porcentajes de pérdida de agua en el sustrato del 80%, así como aplicando estrés osmótico inducido por el riego con una solución de polietilenglicol (PEG) al 25%. Dentro del análisis funcional de la familia *AtLEA4*, se llevaron a cabo estudios correspondientes a la proteína *AtLEA4-5*, realizando un análisis fenotípico de plantas transgénicas que sobre-expresan el gen que codifica para esta proteína y plantas que tienen silenciado, a nivel post-transcripcional, el gen que codifica para la misma. Se encontró que la familia de genes *AtLEA4* y la proteína *AtLEA4-5* se acumulan durante la embriogénesis de la semilla desde etapas tempranas en el desarrollo, a diferencia de lo reportado para otras hidrofílicas tipo LEA, que se acumulan únicamente en la etapa de desecación de la semilla. Por otra parte, los transcritos de la familia *AtLEA4* se acumulan en diferentes niveles en respuesta a ácido abscísico (ABA) y déficit hídrico al aplicar tratamientos de alta salinidad, temperaturas bajas y estrés osmótico en plantas jóvenes, mientras que en plantas adultas se encontraron en todos los órganos de la planta estudiados con excepción de la *AtLEA4-2* en flores. En el caso de plantas jóvenes, la proteína *AtLEA4-5* se acumula de manera similar a los niveles de acumulación del transcrito correspondiente en respuesta a ABA y los tratamientos de déficit hídrico aplicados, mientras que en plantas adultas la acumulación de la proteína en flores es muy similar a la encontrada en raíces, a pesar de que los transcritos son casi 10 veces más abundantes en raíces expuestas a sequía. Las plantas transgénicas que sobre-expresan el gen *AtLEA4-5* mostraron una mayor tolerancia a situaciones de déficit hídrico severas y moderadas, expresado como una mayor acumulación de biomasa, contenido relativo de agua y porcentaje de sobrevivencia comparados con plantas silvestres. En general, se observó una relación entre los niveles de acumulación de la proteína y la tolerancia al déficit hídrico. Por su parte, las plantas silenciadas T_1 mostraron diferentes niveles de reducción en la acumulación de la proteína, pero no mostraron diferencias significativas con respecto a la silvestre, aún en líneas cuyo silenciamiento del gen fue total. Se discute el papel de estas proteínas altamente hidrofílicas en la respuesta adaptativa contra el déficit hídrico, con base en sus características estructurales, sus patrones de expresión y los fenotipos observados en las plantas sobre-expresoras y plantas silenciadas, tomando en cuenta el posible papel de la redundancia funcional que se ha hipotetizado puede ocurrir en esta clase de proteínas.

INTRODUCCIÓN

I. EL DÉFICIT HÍDRICO Y SU EFECTO EN LAS PLANTAS

El estrés se define como cualquier factor externo que ejerce una influencia desventajosa en un organismo. En las plantas, sus efectos se pueden medir en relación al crecimiento (acumulación de biomasa) o en procesos primarios de asimilación, como la fijación de CO₂ o la captación de minerales (Taiz & Zeiger, 1991). El estrés puede ser biótico, cuando se debe a la influencia de otros organismos o abiótico, cuando surge de un exceso o un déficit en las condiciones físicas o químicas del ambiente. El estrés desencadena una variedad de respuestas en las plantas, desde cambios en la tasa de crecimiento y productividad, hasta alteraciones en la expresión genética y el metabolismo (Bray *et al.*, 2000). El déficit hídrico es uno de los tipos de estrés abiótico más comunes que las plantas enfrentan durante su ciclo de vida y que repercute directamente en su desarrollo, crecimiento y productividad. Se presenta en las plantas cuando la tasa de transpiración excede a la toma de agua (Bray, 1997). En cultivos de importancia agronómica, las pérdidas asociadas al estrés abiótico pueden reducir la productividad promedio en un 50 a 80 % dependiendo del cultivo (Boyer, 1982). La sequía, las elevadas concentraciones de sales en el suelo y las temperaturas bajas, son algunos de los tipos de estrés que producen déficit hídrico en las plantas.

El déficit hídrico también es un componente normal de algunos procesos del desarrollo, como en el caso de la mayoría de las angiospermas, que en la última etapa de formación de las semillas pueden tolerar una deshidratación de los tejidos del embrión y sus cubiertas seminales en niveles alrededor del 95% (Bray, 1997). Este mecanismo ocurre debido a que al ser dispersadas, las semillas deben ser capaces de tolerar factores ambientales adversos hasta que se presenten las condiciones adecuadas para su germinación. Durante la pérdida de agua en la semilla, hay una serie de mecanismos que ayudan a proteger de la desecación a las estructuras celulares, evitándoles daños irreparables.

Los primeros efectos del déficit hídrico en las plantas son la inhibición temporal de la tasa de crecimiento de los órganos aéreos y el cierre de estomas para disminuir la pérdida de agua por evapo-transpiración. Esto reduce la captación de CO₂

del ambiente causando una disminución en la fijación de carbono y la producción de energía a través de la fotosíntesis. Otro efecto causado por el cierre de los estomas es la reducción del enfriamiento evaporativo en las hojas, por lo que la temperatura puede elevarse varios grados centígrados, generando también daños asociados al estrés calórico. Si la deshidratación continúa, se empiezan a afectar los componentes celulares, el volumen y forma de la membrana plasmática cambian, hay una concentración de solutos, ruptura de los gradientes de potencial hídrico, pérdida de turgencia, pérdida de la integridad de las membranas, separación de la membrana plasmática de la pared celular, desnaturalización de proteínas, cambios en la actividad de enzimas, así como daños en las estructuras subcelulares (Bray, 1997).

Dentro de la respuesta adaptativa para tolerar la falta de agua en las plantas se han seleccionado dos principales mecanismos: el *escape* y la *tolerancia* al déficit hídrico (Ramanjulu & Bartels, 2002). El *escape* al déficit hídrico se presenta en las plantas que se desarrollan rápidamente en la estación lluviosa y producen semillas antes del período de sequía, como en el caso de las plantas anuales que habitan en los desiertos. Por otra parte, las plantas suculentas previenen la pérdida de agua a través de adaptaciones morfológicas y fisiológicas como la formación de cutículas gruesas, el cerrado y hundimiento de estomas, la reducción del área foliar, la presencia de tejidos almacenadores de agua y el uso del metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). Por otra parte, la *tolerancia* a la desecación es la capacidad de algunas plantas de mantener su desarrollo en condiciones de déficit hídrico; es el resultado de un conjunto de alteraciones fisiológicas y bioquímicas a nivel celular y molecular, tales como cambios en las propiedades físicas de la pared celular, síntesis de enzimas y metabolitos antioxidantes, síntesis de proteínas protectoras de la maquinaria celular, compartimentalización de iones y el ajuste osmótico (Ingram & Bartels, 1996). Es importante destacar que los mecanismos de resistencia a la falta de agua no son excluyentes entre sí, sino que las plantas emplean varios de ellos, aunque desarrollan la tolerancia en diferentes grados. La resistencia o la sensibilidad al estrés dependen de varios factores, que se pueden esquematizar de la siguiente manera (Figura 1):

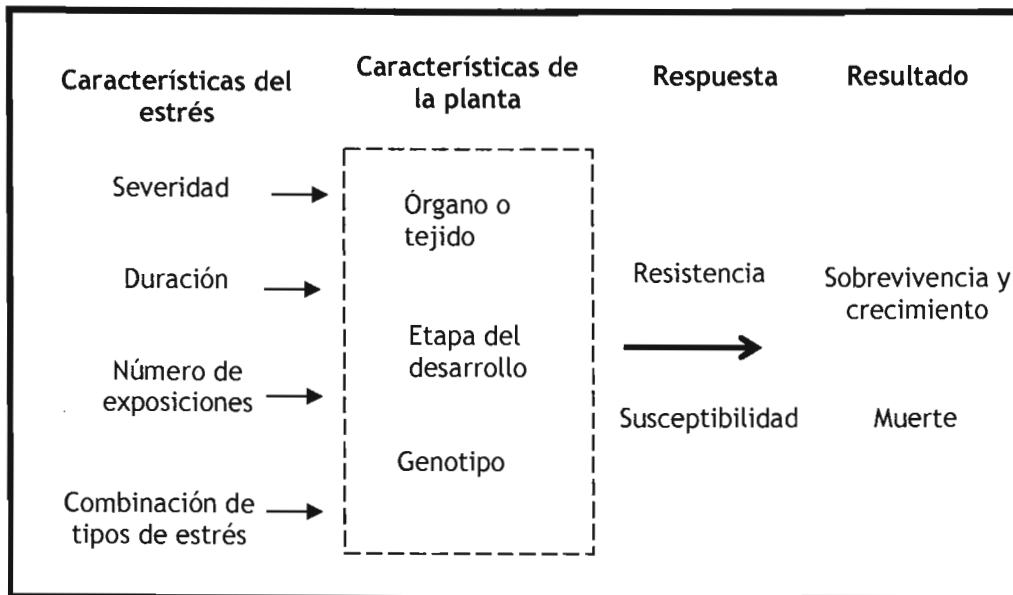


Figura 1. Muchos factores determinan la respuesta de las plantas al estrés ambiental: el genotipo y la etapa del desarrollo de la planta, la duración y severidad del estrés, el número de veces que la planta ha estado sometida al estrés y cualquier efecto aditivo o sinérgico por la presencia de múltiples tipos de estrés. Las plantas tienen una variedad de mecanismos de respuesta a estrés, pero la falla en la recuperación de un estrés severo puede resultar en la muerte de la planta. Modificado de Bray *et al.* (2000).

II. MECANISMOS INVOLUCRADOS EN LA RESPUESTA AL DÉFICIT HÍDRICO

Los cambios en el metabolismo y en el desarrollo inducidos por estrés se pueden atribuir generalmente a una alteración de la expresión genética, algunos genes se reprimen, mientras que otros se inducen. La respuesta al estrés inicia con la percepción del estrés a nivel celular, la cual activa una o varias vías de transducción de señales que a su vez, transmiten la información dentro de la célula y a toda la planta. Dentro de los genes cuya expresión se induce en respuesta a estrés, muchos estudios se han enfocado en la activación transcripcional de la expresión genética, pero cada vez hay más evidencias que indican que los productos finales de la expresión genética están influenciados por mecanismos a nivel post-transcripcional que incrementan la cantidad de RNA mensajeros (RNAm) específicos, promueven la traducción y estabilización de proteínas, alteran la actividad de enzimas o una combinación de éstos (Bray *et al.*, 2000). Recientemente, se ha reportado también la

disminución en la expresión de genes en respuesta a estrés. Uno de los mecanismos que participan en la regulación post-transcripcional de la expresión genética es la degradación de RNAm o la inhibición de la traducción de los mismos, debido a la acción de los microRNAs (miRNAs), que son RNAs no codificantes de 21 a 22 nucleótidos que están involucrados en procesos del desarrollo en eucariotes superiores (Lai, 2003). En general, los miRNAs de plantas tienen una tendencia a regular factores de transcripción tipo MYB, ARF, CBF y AP2 (implicados en el desarrollo y en respuesta a auxinas y frío, entre otras), proteínas de unión a ácidos nucleicos y transductores de señales (Jones-Rhoades & Bartel, 2004, Wang *et al.*, 2004).

A continuación se describen los principales mecanismos que participan en la adquisición de la tolerancia a la desecación, debido al incremento en la expresión de genes de respuesta a déficit hídrico.

II.1 Ajuste osmótico y osmoprotección

El ajuste osmótico se refiere a la acumulación, ante situaciones de déficit hídrico, de compuestos orgánicos solubles de bajo peso molecular que no interfieren con el metabolismo, conocidos como solutos compatibles u osmolitos, entre ellos, aminoácidos (prolina), azúcares/poliolios (manitol, pinitol, trehalosa) y aminos cuaternarias (glicina betaína, dimetilsulfoniopropionato). El resultado es un incremento de solutos en la célula para disminuir el potencial hídrico de los tejidos de la planta, principalmente las hojas, lo cual mantiene un gradiente favorable para la toma de agua, protegiendo así el turgor de las células. Además del ajuste osmótico, también se ha propuesto que dichos compuestos cumplen otros papeles como la estabilización de proteínas y/o membranas, protección de enzimas mediante la disminución en la concentración de radicales libres y la eliminación de iones tóxicos (Wang *et al.*, 2003). Se ha observado que la sobre-producción de enzimas que están involucradas en la síntesis de osmolitos generalmente reducen el estrés por deshidratación de manera significativa (Bajaj *et al.*, 1999).

II.2 Compartimentación de iones

Los transportadores iónicos son los encargados de mantener el balance iónico y permitir la toma de nutrientes del suelo (Serrano *et al.*, 1999). La homeostasis iónica en las células es vital para mantener su correcto funcionamiento. Este balance iónico

se ve perturbado por el estrés osmótico causado por sequía y salinidad, debido al aumento en la concentración de iones de sodio (Na^+) intracelular, lo cual es altamente tóxico para muchas enzimas. En las plantas que están en proceso de aclimatación a condiciones de deshidratación y salinidad, se ha establecido que el mecanismo que utilizan es la excreción de Na^+ de la raíz y la compartimentación de este catión en la vacuola de las células de la hoja. En *Arabidopsis* la entrada de Na^+ está controlada por el transportador HKT1, mientras que la expulsión de Na^+ la llevan a cabo los antiportadores Na^+/H^+ , como el de membrana plasmática denominado SOS1 (por Salt Overly Sensitive) (Shi *et al.*, 2000) o el de la membrana de tonoplasto, conocido como AtNHX1 (Gaxiola *et al.*, 1999), que promueve su almacenamiento dentro de la vacuola. Se ha especulado que la percepción de los niveles de Na^+ citoplásmico la lleva a cabo SOS1 a través de su extremo carboxilo intracelular. Cuando los niveles son altos, se produce una señal de calcio (Ca^{2+}) que desencadena la vía de señalización de SOS: SOS3, una proteína miristoilada de unión a Ca^{2+} interactúa con SOS2, una cinasa de proteínas, activándola para que a su vez, SOS2 fosforile y active a SOS1. Existe evidencia de que SOS2 también regula positivamente la actividad de AtNHX1 y CAX1 (un intercambiador vacuolar de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$) y puede regular negativamente a HKT1 (Figura 2). Entre las bombas de protones que pueden proveer el gradiente de potencial electroquímico para que funcionen los antiportadores Na^+/H^+ están la ATPasa de protones de membrana plasmática y la vacuolar, así como la H^+ -Pirofosfatasa (H^+ -Ppasa) de la membrana del tonoplasto. Se ha encontrado que plantas de *Arabidopsis* transformadas con el gen *AVP1* que codifica para la bomba H^+ -PPasa son más resistentes a sal y sequía (Gaxiola *et al.*, 2001).

La sobre-expresión del antiportador vacuolar AtNHX1 en *Arabidopsis* permite que las plantas crezcan en presencia de 200 mM de cloruro de sodio (Apse *et al.*, 1999) y también confiere resistencia a salinidad en *Brassica napus* (Zhang *et al.*, 2001) y tomate (Zhang & Blumwald, 2001), debido a un incremento en la capacidad de las plantas transgénicas para almacenar Na^+ en la vacuola. La sobre-expresión de SOS1 en *Arabidopsis* (Shi *et al.*, 2003) y el antisentido del transportador de alta afinidad de potasio HKT1 en trigo (Laurie *et al.*, 2002), también confieren un fenotipo de tolerancia a salinidad. En el caso de SOS1, se propone que el mecanismo incluye una menor acumulación de Na^+ en el xilema para prevenir la acumulación de este ión en los tallos. Para HKT1 se observó que la disminución del transportador reduce los niveles de acumulación de Na^+ y resulta en una menor relación Na^+/K^+ en el estele de

la raíz, lo cual podría disminuir a translocación de Na^+ al tallo, limitando la toxicidad del ión en los tejidos fotosintéticos.

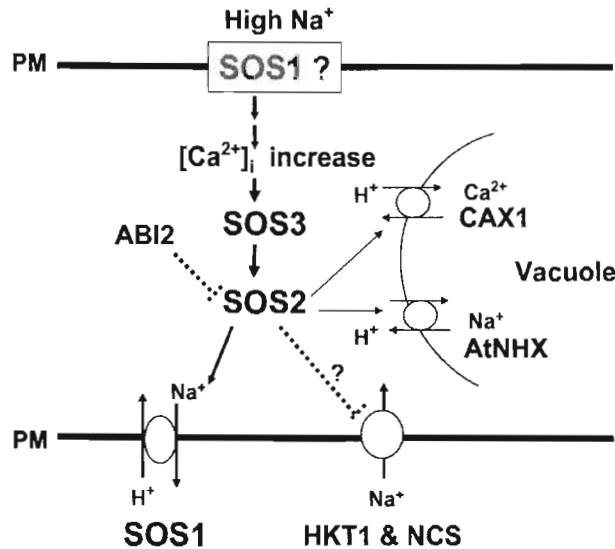


Figura 2. Una elevada concentración de Na^+ desencadena una señal de calcio que activa al complejo de cinasas SOS2-SOS3, el cual estimula después la actividad de intercambio de Na^+/H^+ de SOS1 en la membrana plasmática. SOS2 también activa a los intercambiadores de Na^+/H^+ (AtNHX) y $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (CAX1) de la membrana vacuolar. Se ha demostrado que la fosfatasa ABI2 interactúa físicamente con SOS2 y se propone que lo inactiva. La vía de SOS2 puede disminuir la actividad de los transportadores de influjo de sodio (AtHKT1 y NCS). SOS1 en color gris indica que este transportador puede tener un papel sensorial también. Las líneas punteadas indican una posible regulación. Reproducido de Zhang *et al.* (2004).

II.3 Respuesta anti-oxidante

Una consecuencia de muchos tipos de estrés ambiental, incluyendo la sequía, es el estrés oxidativo, es decir, la acumulación de especies reactivas de oxígeno, ROS (O_2 , H_2O_2 y OH^-) que dañan membranas y macromoléculas (Smirnoff, 1998). En condiciones de estrés oxidativo se ha observado la acumulación de enzimas antioxidantes, como catalasa, superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa, glutatión-S-transferasas y glutatión peroxidasa, y de moléculas como el glutatión, ascorbato, carotenoides y antocianinas. La sobre-expresión de estas enzimas incrementa la tolerancia de diferentes especies vegetales a bajas temperaturas, déficit hídrico y salinidad mediante un incremento en el mecanismo de secuestro de radicales libres y ROS para proteger cloroplastos, así como minimizando la producción de radicales de oxígeno libres después de congelamiento, etc. (Wang *et al.*, 2003). Por otra parte, se sabe también que la presencia de ROS está asociada a la defensa contra patógenos y que el

déficit hídrico puede inducir genes de respuesta a patógenos. Entre ellos se inducen los que codifican para endoquitinasas, que se secretan a la pared celular de las plantas para degradar la pared celular de hongos y bacterias (Chen *et al.*, 1994).

II. 4 Facilitamiento del flujo de agua

Se ha reportado la inducción, en respuesta a deshidratación, de genes que codifican para acuaporinas, que son canales protéicos transmembranales que facilitan el transporte de agua a lo largo de gradientes de potencial hídrico, regulan la conductividad hidráulica de las membranas e incrementan la permeabilidad al agua de 10 a 20 veces (Maurel & Chrispeels, 2001). La inducción de estos genes se relaciona con procesos de expansión celular y de déficit hídrico, en este último caso promoviendo una rápida recuperación de la turgencia al momento de la rehidratación. La acuaporina codificada por el gen *rd28* de *Arabidopsis* se induce por deshidratación (Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 1992). Esta acuaporina pertenece a la familia de proteínas MIP (por Major Intrinsic Proteins), de las cuales también se han encontrado proteínas relacionadas en *Mesembryanthum crystallinum*. En esta planta halófila, se encontró que los niveles de acumulación de transcritos *MIP A*, *B* y *C* correlacionan con los cambios en la turgencia de hojas de plantas sometidas a tratamientos con 400 mM de NaCl (revisado en Bray *et al.*, 2000). La sobre-producción de la acuaporina RWC3 en arroz, incrementa el potencial hídrico de las hojas y la conductividad hidráulica de las raíces, por lo que se sugiere que esta acuaporina juega un papel en el mecanismo de escape a la sequía en esa variedad de arroz (Lian *et al.*, 2004).

II.5 Transferasas de lípidos

Las transferasas no específicas de lípidos (LTPs), son proteínas solubles de bajo peso molecular, secretadas a la pared celular y que se piensa están implicadas en la síntesis de cutícula a través de la secreción y deposición de sustancias lipofílicas desde las células epidérmicas en expansión (Kader, 1996). Su inducción ante déficit hídrico, preferencialmente en las partes aéreas, puede representar una respuesta adaptativa de la planta, incrementando el grosor de la cutícula para reducir la pérdida de agua en condiciones de estrés. Algunos ejemplos de LTPs que se inducen por estrés son la TSW12 de tomate, en respuesta a sal (Torres-Schuman *et al.*, 1992) y

PvLTP-24 de frijol, en respuesta a sequía y ácido abscísico (ABA) (Colmenero-Flores *et al.*, 1997).

II.6 Protección de organelos involucrados en la fotosíntesis

Las enzimas responsables de llevar a cabo la fotosíntesis son muy sensibles al daño por sequía, por lo que es necesario protegerlas durante la deshidratación y repararlas rápidamente al momento de la rehidratación. En la planta de resurrección *Craterostigma plantagineum*, se encontraron tres genes expresados preferencialmente durante la desecación que codifican para proteínas de estrés localizadas en los cloroplastos, como las DSP22 y la DSP34, localizadas en los tilacoides, y la DSP21 que se encuentra en el estroma (Schneider *et al.*, 1993). En *Solanum tuberosum*, la proteína de cloroplasto CDSP32, localizada en el estroma y la proteína CDSP34, que se encuentra en los tilacoides, se inducen en respuesta a sequía (Pruvot *et al.*, 1996, Rey *et al.*, 1998). Su papel en la respuesta a sequía puede ser la estabilización de las membranas de los tilacoides y la participación en mecanismos de reparación y protección de proteínas.

II.7 Degradación y reparación de proteínas

La actividad proteolítica durante condiciones de estrés es elevada y coincide con el proceso de muerte celular programada. La actividad de proteasas y el proteasoma 26S puede estar involucrada en la degradación de proteínas desnaturalizadas por la deshidratación. Por otra parte, se ha reportado la inducción de inhibidores de proteasas específicamente por deshidratación, como el caso de WSCP de coliflor, que puede proteger a ciertas proteínas de la actividad proteolítica que se presenta ante situaciones de estrés y de muerte celular programada (Nishio & Satoh, 1997). Por otra parte, las proteasas inducidas por sequía pueden alterar el metabolismo al incrementar la tasa de recambio de ciertas proteínas, degradando polipéptidos desnaturalizados por el estrés o proteínas de reserva. Otro daño causado por la falta de agua es la modificación química de los residuos de proteínas, como la desaminación y la oxidación, que pueden causar la pérdida de la actividad o la conformación nativa de las proteínas. En este sentido, se ha observado en plantas de trigo sujetas a déficit hídrico un incremento de la síntesis y actividad de la L-isoaspartilo metiltransferasa, que repara los residuos dañados de L-isoaspartilo a residuos funcionales (Mudgett & Clarke, 1994).

II. 8 Modificaciones de la pared celular

Uno de los procesos de respuesta al déficit hídrico en las células vegetales menos estudiados es la modificación de carbohidratos y proteínas que constituyen la pared celular, los cuales determinan el grado de rigidez o extensibilidad de la pared. Debido a que una de las primeras respuestas ante el déficit hídrico es la inhibición del crecimiento, la modificación de los componentes de la pared puede ser responsable de que se detenga la expansión celular, lo cual se ha verificado en plantas de maíz sometidas a estrés osmótico (Chazen & Neumann, 1994). En plantas de frijol sometidas a tratamientos de deshidratación y ABA se observó la acumulación de proteínas básicas de peso molecular aparente de 22, 33 y 36 kDa (Covarrubias *et al.*, 1995). Las dos últimas proteínas (denominadas p33 y p36) están relacionadas a proteínas ricas en prolina y también se ha reportado su interacción con una proteína de 80 kDa de la pared celular análoga a las integrinas de animales, lo cual sugiere que su función es facilitar la comunicación entre células y/o proveer soporte físico a las células durante el déficit hídrico (García-Gómez *et al.*, 2000).

II.9 Proteínas protectoras de la maquinaria celular

Las proteínas de choque térmico (HSPs) y las proteínas de embriogénesis tardía (LEAs) son dos tipos de proteínas muy importantes dentro de la respuesta adaptativa ante déficit hídrico, salinidad y temperaturas extremas (Ingram & Bartels, 1996). Se ha demostrado que ambas juegan un papel en la protección celular durante estrés. Las proteínas de choque térmico se agrupan en varias familias, están conservadas desde bacterias hasta mamíferos y se inducen de manera abundante en estrés por calor. Su función primordial es la de chaperonas moleculares, que entre otras funciones, ayudan a prevenir el plegamiento incorrecto de proteínas inmaduras o que están siendo translocadas a través de una membrana, aumentan la estabilidad de proteínas en su conformación nativa, facilitan el plegamiento correcto de proteínas desnaturalizadas, reactivándolas y previenen la agregación de proteínas desnaturalizadas o deshacen los agregados ya formados. Dentro de las cinco familias de HSPs (HSP100, HSP90, HSP70, HSP60 y sHSP) las sHSPs (por small Heat Shock Proteins) responden a sequía, a diferencia de las demás familias, que se inducen por otros estímulos, como estrés calórico, etanol y metales pesados. Las sHSPs se encuentran muy abundantemente en plantas, son proteínas de bajo peso molecular (17-28 kDa) que forman oligómeros de 9 a más de 30 subunidades (Vierling, 1991). Se

han agrupado en cinco familias, dos de ellas se localizan en el citosol y las restantes se localizan en el cloroplasto, retículo endoplásmico y mitocondrias, respectivamente. Su localización diferencial sugiere una divergencia funcional a nivel subcelular y durante el desarrollo, así como durante condiciones de estrés (Waters *et al.*, 1996). Por ejemplo, una sHSP de frijol (PvHSP17/ RSP19) se induce por déficit hídrico principalmente en raíces, pero también responde a ABA, choque térmico y se acumula durante la embriogénesis tardía, expresándose aún en plantas no estresadas (Colmenero-Flores *et al.*, 1997). La sobre-expresión de AtHSP17.6A en *Arabidopsis* incrementa la tolerancia a estrés osmótico y calor (Sun *et al.*, 2001). Por otra parte, las proteínas LEA (por Late Embryogenesis Abundant) también se ha propuesto que realizan una función protectora en condiciones de déficit hídrico. Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en plantas, se expresan en respuesta a déficit hídrico inducido por sequía, salinidad y temperaturas bajas, así como en la fase de desecación de las semillas. Estas proteínas son el tema de estudio de este trabajo y se abordarán a detalle en la sección IV.

III. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA EN RESPUESTA A DÉFICIT HÍDRICO

El primer paso en la regulación de la respuesta al déficit hídrico es el reconocimiento de la señal, ésto desencadena su transducción y amplificación, para que finalmente se activen un conjunto de genes implicados en la respuesta al estrés. Existen varios parámetros por los cuales una célula vegetal puede medir la pérdida de agua, tales como la disminución o pérdida del turgor, los cambios en el volumen celular o el área de la membrana plasmática, la pérdida de la tensión de la membrana, el aumento en la concentración de solutos intracelulares y las alteraciones en las conexiones entre la membrana plasmática y la pared celular (Bray, 1997).

III.1 Percepción del estrés

Dado que las bajas temperaturas, la sequía y las altas concentraciones de sales son estímulos con atributos específicos que, a su vez, comparten elementos que pueden representar nodos o puntos de interacción entre diferentes vías de señalización, es de esperarse que existan múltiples sensores primarios para diferenciar la señal de estrés. Se ha demostrado que estos tres tipos de estrés inducen flujos transitorios de Ca^{2+}

hacia el citoplasma, ya sea por un influjo del espacio apoplástico o por su liberación desde un almacén interno, por lo que los canales responsables de este flujo pueden representar un tipo de sensor para estas señales de estrés. La cinética, magnitud y fuente celular de las elevaciones en el Ca^{2+} citoplasmático (conocido como firma de calcio) pueden codificar la información del estímulo particular y determinar la respuesta final específica (Knight & Knight, 2001). En plantas sujetas a una rápida disminución de la temperatura se ha encontrado que ocurre un influjo de Ca^{2+} debido a alteraciones en la fluidez de la membrana y reorganizaciones del citoesqueleto (revisado en Xiong *et al.*, 2002).

En levaduras se han caracterizado dos osmosensores: SHO1, que es una proteína transmembranal que se activa en condiciones de alta osmolaridad, y un sistema de dos componentes de cinasas de histidinas, en el que participan las proteínas SLN1, YPD1 y SSK1, cuya expresión se reprime en respuesta a estrés osmótico. Ambos sistemas de percepción de la pérdida de turgor durante estrés osmótico conducen a la activación de una cinasa de proteínas denominada HOG, la cual forma parte de una cascada de fosforilación por MAPK (por Mitogen Activated Protein Kinases), conocida como fosfo-relevo, que controla la respuesta de la levadura ante este tipo de estrés (Bray, 1997). En plantas pareciera existir un mecanismo similar ya que se ha descrito una histidina cinasa en *Arabidopsis*, AtHK1, que puede complementar a una mutante *sln1* de levadura (Urao *et al.*, 1999).

III. 2 Transducción de la señal

El análisis de promotores de genes que responden a estrés hídrico ha arrojado información sobre cuatro sistemas reguladores independientes para la expresión genética, dos vías dependen de la fitohormona ABA y dos son independientes de ella (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000). El ABA es sin duda la fitohormona que está más íntimamente involucrada en la transducción de señales de estrés hídrico, otras fitohormonas que están involucradas en la respuesta a estrés biótico y abiótico son etileno, ácido jasmónico y ácido salicílico (Xiong *et al.*, 2002). El ABA es un isopreno de 15 carbonos derivado de la ruptura oxidativa de un precursor epoxi-carotenoide (9'-cis-neoxantina) en la vía no mevalónica, también denominada vía MEP (por Methyl Erythritol Phosphate), que se lleva a cabo en los cloroplastos (Milborrow, 2001). El ABA regula varios procesos fisiológicos y del desarrollo, como la adaptación a diferentes tipos de estrés ambiental, la maduración de las semillas (deseccación y

dormancia) y la germinación. Se ha demostrado que en tejidos vegetativos sujetos a estrés osmótico aumentan los niveles de ABA y que su aplicación a tejidos no estresados, asemeja las respuestas fisiológicas y moleculares del déficit hídrico (Campalans *et al.*, 1999). La forma en que se reconoce el ABA no se sabe bien hasta la fecha, pero las evidencias experimentales indican que puede ser reconocido dentro y fuera de la célula y que existen múltiples receptores para ABA, de acuerdo a los resultados basados en la respuesta de genes a análogos estructurales de esta molécula (Allan & Trewavas, 1994, Finkelstein *et al.*, 2002).

Los datos que se tienen hasta el momento indican que la señal de ABA incluye varios elementos, entre ellos, una elevación en la concentración de calcio citosólico libre, la participación del segundo mensajero cADPR (adenosina cíclica 5-difosfato ribosa) en la movilización de calcio, así como la actividad de cinasas de proteínas y fosfatasa de proteínas. En el caso de las cinasas de proteínas se han aislado y caracterizado, entre otras, a cinasas dependientes de calcio (CDPK) como la AtCDPK1 y AtCDPK2, algunas MAPK que involucran una cascada de fosforilación y activación de cinasas, la cinasa de serina/treonina AAPK localizada en células guarda de haba, una cinasa con similitud a receptores tipo-RPK1 en *Arabidopsis*, la proteína cinasa PKABA de trigo, todas ellas inducidas en respuesta a diferentes tipos de estrés. Una proteína que puede funcionar como regulador negativo en la señalización de ABA es una farnesil transferasa, cuya subunidad β está codificada por el gen *ERA1* (por Enhanced Response to ABA), que podría catalizar la modificación (localización a la membrana plasmática) de un receptor o un componente de la señal de ABA (Cutler *et al.*, 1996). En *Arabidopsis* se ha identificado un sensor de calcio que es una proteína similar a calcineurina B (CBL9) inducible por ABA y varias señales de estrés, que funciona como un regulador negativo en la sensibilidad a estos estímulos además de participar en la regulación de la biosíntesis de ABA en respuesta a estrés (Pandey *et al.*, 2004). Una proteína de unión a calmodulina (AtCaMBP25) se propone como regulador negativo de la tolerancia a estrés osmótico inducido por manitol y NaCl, ya que la sobre-expresión del gen que la codifica provoca un aumento en la sensibilidad a ellos durante la germinación y el crecimiento de la plántula, sin embargo no tiene efecto en la tolerancia a sequía y congelamiento (Perruc *et al.*, 2004). El análisis con mutantes de plantas afectadas en la sensibilidad (mutantes *abi* o insensibles a ABA) o en la producción de ABA (mutantes *aba* o deficientes en ABA), ha arrojado resultados muy informativos en la caracterización de la cascada de señalización de ABA y ha

permitido demostrar que se requiere de ABA para la expresión de ciertos genes específicos inducidos por sequía. En *Arabidopsis* se han aislado y caracterizado cinco mutantes insensibles a la aplicación de ABA exógeno. Las mutantes *abi1* y *abi2* están alteradas en su respuesta a ABA en semillas y tejidos vegetativos, ya que presentan una sensibilidad reducida en la germinación y mantienen los estomas abiertos en presencia de ABA y deshidratación, por lo que se marchitan rápidamente. Ambos genes codifican para fosfatasa de proteínas tipo 2C (PP2C) y tienen un dominio de unión a calcio en el extremo amino (Xiong *et al.*, 2002). La mutante *abi3* también germina en presencia de ABA, pero se asemeja al tipo silvestre en sus relaciones hídricas. El producto del gen *ABI3* codifica para un factor transcripcional con un dominio B3 y las semillas de estas mutantes no muestran dormancia. Por su parte *ABI4* y *ABI5* son factores transcripcionales con dominios AP2 y bZIP, respectivamente, y las plantas mutantes en estos genes muestran insensibilidad a ABA en la germinación y también presentan un fenotipo de crecimiento resistente a azúcar (Finkelstein *et al.*, 2002). Se conocen mutantes deficientes en ABA en tomate, chícharo, maíz, tabaco, cebada, papa y *Arabidopsis*. Entre las alteraciones fenotípicas de las mutantes *aba1*, *aba2* y *aba3* están la falta de dormancia en la semilla, la alteración en las relaciones hídricas y la pobre aclimatación a una variedad de tipos de estrés (Koorneef *et al.*, 1998).

III. 3 Activación transcripcional de genes

Se han identificado varios elementos que actúan en *cis* en los promotores de genes que responden a déficit hídrico, entre ellos, el elemento de respuesta a ABA (ABRE) y el elemento de respuesta a deshidratación (DRE)/(CRT) (Bray, 1997). El elemento ABRE es una secuencia de 8 a 10 pares de bases presente en los promotores de genes inducibles por ABA que comparten la secuencia consenso (C/T)ACGTGGC, la cual contiene el motivo palindrómico ACGT. Se ha demostrado que este motivo palindrómico está presente también en otros elementos regulatorios, como la caja G, implicada en la regulación de genes regulados por luz, auxinas, jasmónico y salicílico. Se ha sugerido que los nucleótidos que flanquean el motivo palindrómico de la caja ABRE pueden ser importantes en la regulación de la respuesta (Ingram & Bartels, 1996). Aunque en muchos genes la presencia de este elemento es suficiente para su expresión mediada por ABA, en algunos genes se han caracterizado elementos adicionales en *cis* que complementan al elemento ABRE, denominados elementos

acopladores (CE), que dan una mayor especificidad de la respuesta a través de la unión a diferentes factores transcripcionales. En el gen de cebada *HVA22*, el elemento acoplador CE1 (TGCCACCGG) es necesario junto con un ABRE para su regulación por ABA, mientras que en el gen *HvA1*, cuyo producto es una proteína LEA del grupo 3, se requiere del elemento CE3 (ACGCGTGCCTC) (Bray, 1997). Se han aislado varias proteínas de unión a ABRE, entre ellas, las que poseen una región básica adyacente a un motivo de cierre de leucinas (bZIP), característico de los factores de transcripción, como EMBP1 de trigo, TAF-1 de tabaco, TRAB de arroz (Ingram & Bartels, 1996), así como los factores ABF/AREB y ABI5 aislados en *Arabidopsis*, cuya transcripción se induce también en respuesta a estrés osmótico y ABA (Choi *et al.*, 2000, Uno *et al.*, 2000, Finkelstein & Lynch, 2000). Otro tipo de factores transcripcionales involucrados en la respuesta a ABA son los de tipo MYB y MYC, que se sintetizan después de la acumulación de ABA endógeno. El gen *RD22* de *Arabidopsis* se induce por ABA y en su promotor se encuentran motivos conservados para la unión de proteínas tipo MYC y MYB (Iwasaki *et al.*, 1995). Otros homólogos que se han identificado también en *Arabidopsis* se inducen por sequía y salinidad (Abe *et al.*, 1997). *AtMYC2* y *AtMYB2* actúan como activadores transcripcionales en la inducción de la expresión genética en respuesta a ABA y su sobre-expresión incrementa la tolerancia a estrés osmótico, medido como una disminución en la pérdida de electrolitos de plantas tratadas con manitol (Abe *et al.*, 2003). Así mismo, la expresión constitutiva de ABF3 y ABF4 en *Arabidopsis*, incrementa la tolerancia a sequía, medida como un mayor porcentaje de sobrevivencia después de rehidratar plantas que estuvieron sometidas a un periodo de 12 días sin riego, así como una menor tasa de transpiración debida a una menor apertura estomática en las hojas, como ocurre en la mutante *era1* (Kang *et al.*, 2002). Las cascadas transcripcionales de las vías dependientes de ABA en respuesta a sequía se esquematiza en la Figura 3.

En el caso de genes cuya inducción respuesta a estrés es independiente de ABA, se ha encontrado el elemento DRE/CRT (por Dehydration-Responsive Element/C-Repeat) en sus promotores, cuya secuencia consenso es T(A/G)CCGACAT. El elemento DRE se identificó por primera vez en el promotor de un gen de respuesta a sequía (*RD29A*) de *Arabidopsis*, que codifica para una proteína similar a LEA (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1994). Los niveles de transcripción de *RD29A* en mutantes *abi1* y *aba1* sugirió que la expresión de este gen en respuesta a frío y sequía no dependía de ABA (Kizis *et al.*, 2001). Se han identificado varias proteínas de unión a DRE como

las CBF/DREB (por CRT-Binding Factor/DRE Binding proteins) en *Arabidopsis*. Estas proteínas pertenecen a una familia de factores de transcripción exclusiva de plantas, denominada AP2/EREBP (por APetala2/Ethylene-Responsive Element-Binding Protein), de la que varios de sus miembros están involucrados en el desarrollo y la expresión genética en respuesta a hormonas (Kizis *et al.*, 2001). Estos factores transcripcionales comparten una región de 60 a 70 aminoácidos, el dominio AP2, el cual está compuesto de dos módulos, uno de 20 aminoácidos básicos e hidrofílicos en la región amino (elemento YRG) y una secuencia en el extremo carboxilo que puede formar una α -hélice anfipática (elemento RAYD) (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000). La expresión de todos los genes CBF/DREB1 en *Arabidopsis* es baja en condiciones normales de crecimiento, pero incrementa en respuesta a frío, como en el caso de los factores CBF1-3 (Gilmour *et al.*, 1998) y en el caso de CBF4, en respuesta a sequía, de manera dependiente de ABA (Haake *et al.*, 2002). Se ha identificado un factor transcripcional denominado ICE1 que se une a secuencias MYC dentro del promotor del gen *CBF3*, y que activa su expresión en respuesta a frío (Chinnusamy *et al.*, 2003). ICE1 está regulado por HOS1, una proteína que está involucrada en la degradación de proteínas nucleares dependiente de ubiquitina. Otras proteínas con dominios AP2, cuya expresión aumenta junto con la inducción de CBF1-3 son RAP2.1 y RAP2.6, mientras que la expresión de los factores CBF reduce la expresión de LOS2, el cual es un represor de un factor transcripcional llamado STZ/ZAT10, el cual regula negativamente a su vez la expresión de genes COR/RD (revisado por Zhang *et al.*, 2004). Los elementos que participan en la vía de señalización dependiente de ABA en respuesta a frío y su posible comunicación con la vía dependiente de ABA, se presentan en la Figura 3. La sobre-expresión de CBF4 en *Arabidopsis* promueve la inducción constitutiva de genes de respuesta a estrés que contienen el elemento CRT/DRE e incrementa los porcentajes de sobrevivencia de plantas que estuvieron sometidas a un periodo de sequía y congelamiento, y disminuye la temperatura que causa el 50% de pérdida de electrolitos (EL_{50}) en plantas aclimatadas y no aclimatadas (Haake *et al.*, 2002). La sobre-expresión de CBF1 en *Arabidopsis* induce la expresión de genes regulados por frío, entre ellos, algunos genes relacionados a genes *LEA*, denominados *COR* (por COld-Responsive) e incrementa la tolerancia a congelamiento, medida como una mayor sobrevivencia en plantas adultas y una menor pérdida de electrolitos en hojas cortadas de la planta y sometidas a diferentes temperaturas de congelación (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998). De igual manera, la sobre-expresión de

DREB1A, incrementa la sobrevivencia de plantas sujetas a deshidratación, congelamiento y salinidad en plantas de *Arabidopsis* (Kasuga *et al.*, 1999). Las proteínas DREB2 se inducen por deshidratación, dando como resultado la expresión de genes involucrados en la tolerancia al estrés por sequía, pero su sobre-expresión no resulta en una mayor tolerancia al estrés (Liu *et al.*, 1998), probablemente debido a que se requiere alteraciones post-transcripcionales para que estas proteínas sean activas (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Estos resultados indican que existen

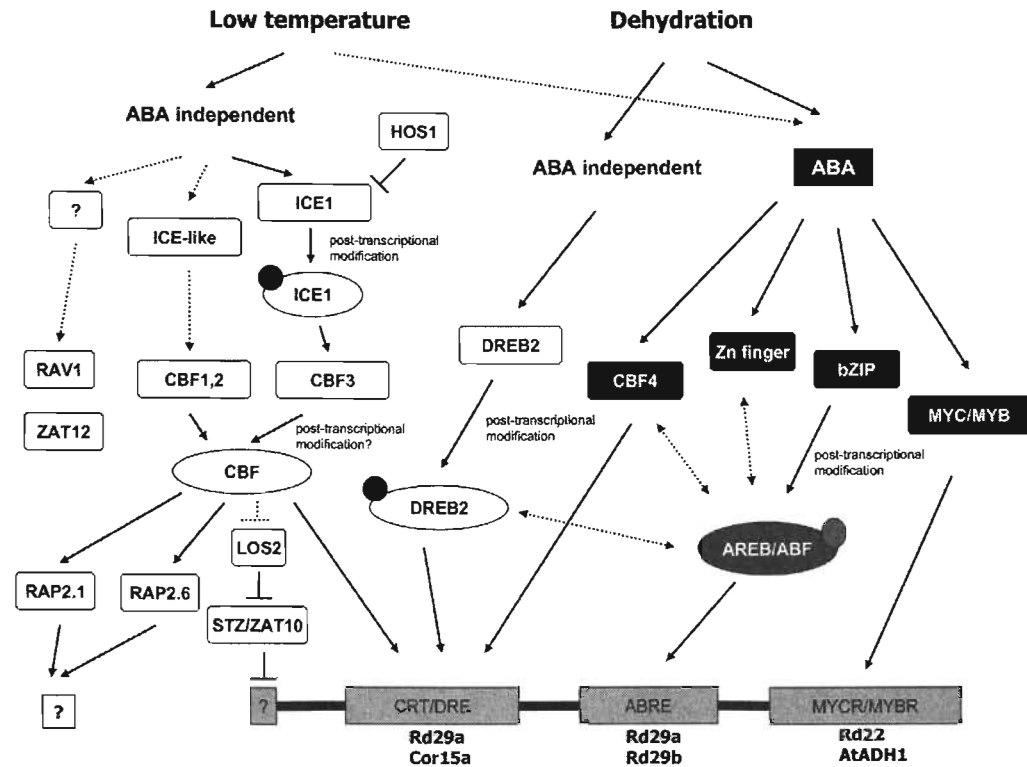


Figura 3. Cascadas transcripcionales de las vías de señalización por bajas temperaturas y deshidratación. Los factores transcripcionales dependientes de ABA están sombreados, mientras que los independientes de ABA están en fondo claro. Los círculos pequeños indican modificaciones post-transcripcionales, como fosforilación. Los sitios de unión de factores de transcripción están representados como rectángulos en la parte de debajo de la figura, con promotores representativos enlistados abajo. Las líneas punteadas indican una posible regulación. Las líneas de con doble flecha indican un posible cruce entre vías de señalización. Reproducido de Zhang *et al* (2004).

al menos dos familias independientes de factores tipo CRT/DREB que funcionan como activadores transcripcionales en vías de transducción de señales separadas (Ramanjulu & Bartels, 2002). Los genes CBF se han utilizado con mucho éxito para otorgar tolerancia al estrés abiótico en varias especies (Tabla 1). La expresión

constitutiva de los genes *CBF* de *Arabidopsis* en plantas de *Brassica napus* resulta en un incremento en la tolerancia a congelamiento, ya que disminuye también la temperatura de EL₅₀ (Jaglo *et al.*, 2001). Un gen ortólogo de arroz (*OsDREB1*) sobre-expresado en *Arabidopsis*, otorga un fenotipo de tolerancia a sal, sequía y frío (Dubouzet *et al.*, 2003).

Tabla 1. Ingeniería genética de la tolerancia al estrés abiótico: respuesta de plantas transgénicas que sobre-expresan genes involucrados en la tolerancia a estrés.

Gen	Nombre del gen/ proteína	Organismo fuente/ planta transgénica	Fenotipo de la planta transgénica*	Refs.
SÍNTESIS DE OSMOPROTECTORES				
<i>codA</i>	Colina oxidasa (síntesis de glicina betaína)	<i>Arthrobacter globiformis/ Arabidopsis thaliana Oryza sativa</i>	Incremento en la germinación y crecimiento de plántulas en presencia de temperaturas bajas (0°C y 10-15°C, respectivamente). Cuando se localiza a cloroplastos las plantas son más tolerantes a la foto-inhibición en presencia de sal y frío.	56, 57, 125
<i>mt1D</i>	Manitol-1- fosfato deshidrogenasa (síntesis de manitol)	<i>Escherichia coli/ Nicotiana tabacum, A. thaliana</i>	Mayor crecimiento (altura, peso fresco) en alta salinidad. Mayor germinación en alta salinidad.	143, 145
<i>otsA, otsB</i>	Trehalosa-6- fosfato sintasa/fosfatasa (síntesis de trehalosa)	<i>E. coli / O. sativa</i>	Crecimiento sostenido y menor daño foto-oxidativo bajo sequía, salinidad y baja temperatura.	43
<i>P5CS</i>	Pirrolin-5- carboxilato sintasa (síntesis de prolina)	<i>Vigna aconitifolia/ N. tabacum O. sativa</i>	Aumento en la longitud y biomasa de raíces, número de semillas por cápsula bajo estrés salino. Incremento en la biomasa en plántulas expuestas a 100mM de NaCl durante 5 días o plantas adultas en sequía.	75, 176
<i>sacB</i>	Fructosil transferasa (síntesis de fructanos)	<i>Bacillus subtilis/ N. tabacum</i>	Mayor crecimiento de plantas (biomasa, TRC, especialmente las raíces) sometidas a estrés osmótico inducido por PEG 10,000.	111
<i>tps1</i>	Trehalosa-6- fosfato sintetasa (síntesis de trehalosa)	<i>Saccharomyces cerevisiae/ N. tabacum</i>	Mayor sobrevivencia de plantas después de 15 días sin riego. En el porcentaje de pérdida de agua en hojas cortadas no hay cambios respecto al control.	122
SÍNTESIS DE PROTEÍNAS LEA, SIMILARES A LEA Y CHAPERONAS MOLECULARES				
<i>LE25</i>	Proteína LEA de la familia 4	<i>Lycopersicon esculentum/ S. cerevisiae</i>	Tolerancia a congelamiento y alta salinidad.	65
<i>HVA1</i>	Proteína LEA de la familia 3	<i>Hordeum vulgare/ O. sativa,</i>	Plántulas crecidas en 100 mM NaCl o 200 mM manitol se recuperan mejor. Plantas adultas mantienen su crecimiento y tienen un mayor CRA durante sequía y salinidad y	7, 133, 169

		<i>Triticum aestivum</i>	presentan menos daños después de rehidratarlas. Mejor protección de membranas durante sequía. Mayor productividad y EUA bajo sequía.	
EM	Proteína LEA de la familia 1	<i>T. eastivum</i> / <i>S. cerevisiae</i>	Promueve el crecimiento en medios con alta osmolaridad (1 M NaCl/KCl, 1.5 M sorbitol).	141
COR15A	Gen inducido por frío, similar a LEA	<i>A. thaliana</i> / <i>A. thaliana</i>	Incremento en la tolerancia a congelamiento en cloroplastos <i>in vivo</i> y protoplastos <i>in vitro</i> .	6, 138
WCS19	Gen inducido por frío, similar a LEA de la familia 3	<i>T. eastivum</i> / <i>A. thaliana</i>	Incremento en la tolerancia a congelamiento (mayor LT ₅₀) y en la resistencia a fotoinhibición en plantas aclimatadas.	101
PMA80 PMA 1959	Proteínas LEA de la familia 1 y 2	<i>T. aestivum</i> / <i>O. sativa</i>	Mayor integridad de membranas en tratamientos de salinidad, mayor acumulación de biomasa y recuperación después de sequía y salinidad.	21
AtHSP 17.6A	Proteína de choque térmico de bajo peso molecular	<i>A. thaliana</i> / <i>A. thaliana</i>	Mayor sobrevivencia y peso fresco después de 3 semanas en 75 mM NaCl.	140
FACTORES TRANSCRIPCIONALES (FT)				
CBF1	FT inducible por frío	<i>A. thaliana</i> / <i>A. thaliana</i> , L. <i>esculentum</i> , <i>Fragaria vesca</i>	Tolerancia a temperaturas bajas. Tolerancia a sequía, frío y estrés oxidativo Tolerancia a congelamiento.	62, 63, 69, 107
CBF 1-3	FT inducibles por frío	<i>A. thaliana</i> / <i>Brassica napus</i>	Tolerancia a congelamiento (medido por la disminución en la EL ₅₀) en plantas no aclimatadas al frío y en plantas aclimatadas.	68
DREB1A/ CBF3	FT inducible por frío	<i>A. thaliana</i> / <i>A. thaliana</i>	Mayor sobrevivencia después de tratamientos de sequía (2 semanas sin riego), congelamiento (-6° C 2días) y salinidad (riego con 600 mM NaCl) en plantas de tres semanas. Disminución en la EL ₅₀ en plantas no aclimatadas (-8° C) y aclimatadas (-11° C).	74
CBF4	FT inducible por sequía	<i>A. thaliana</i> / <i>A. thaliana</i>	Tolerancia a congelamiento medido como una mayor recuperación y menor EL ₅₀ . Mayor sobrevivencia y recuperación después de sequía.	53
ICE 1	FT tipo bHLH	<i>A. thaliana</i> / <i>A. thaliana</i>	Mayor sobrevivencia después de congelamiento (-8° C) en plantas aclimatadas.	22
AtMYC2/ AtMYB2	FT dependientes de ABA	<i>A. thaliana</i> / <i>A. thaliana</i>	El porcentaje de pérdida de electrolitos en riego con manitol es menor que la silvestre.	2
ABF3/4	FT dependientes de ABA	<i>A. thaliana</i> / <i>A. thaliana</i>	Mayor sobrevivencia después de 2 semanas sin riego, menor pérdida de peso fresco (por una menor transpiración) en hojas cortadas por un cerrado parcial de estomas.	73
HSF1/ HSF3	FT de respuesta a estrés calórico	<i>A. thaliana</i> / <i>A. thaliana</i>	Síntesis constitutiva de genes que codifican para proteínas de choque térmico	82, 113

			e incremento en la termotolerancia basal.	
<i>HSFA1</i>	FT de respuesta a estrés calórico	<i>L. esculentum/ L. esculentum</i>	Incremento en la termotolerancia medido por la renaturalización de un reportero.	95
DETOXIFICACIÓN DE RADICALES LIBRES				
<i>CHYB</i>	β -caroteno hidroxilasa (síntesis de zeaxantina)	<i>A. thaliana/A. thaliana</i>	Mayor tolerancia a alta luminosidad y temperaturas elevadas, medida como una reducción en la necrosis de hojas y peroxidación de lípidos.	31
<i>SOD</i>	Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD) Fe-SOD Mn-SOD	<i>Pisum sativum/ N. tabacum</i> <i>N. plumbaginifolia/ Medicago sativa</i>	Retención del 90% de fotosíntesis bajo estrés por alta luz y bajas temperaturas. Protección de plantas contra daño por ozono (estrés oxidativo). Incremento en la tolerancia a congelamiento, déficit hídrico y mayor sobrevivencia en invierno.	51, 52, 91-93, 154
<i>Nt107</i>	Glutación-S-transferasa (reductor de radicales libres)	<i>N. tabacum/ N. tabacum</i>	Mayor crecimiento de plántulas en estrés salino y bajas temperaturas.	123
<i>MsALR</i>	Aldosa/aldehído Reductasa	<i>Medicago sativa/ N. tabacum</i>	Tolerancia a daño oxidativo causado por paraquat y metales pesados, menor peroxidación de lípidos y mayor recuperación de plantas después de sequía.	105
TRANSPORTADORES IÓNICOS				
<i>AtNHX1</i>	Antiportador de Na ⁺ /H ⁺ vacuolar	<i>A. thaliana/A. thaliana,</i> <i>B. napus,</i> <i>L. esculentum,</i>	Crecimiento y desarrollo sostenidos en presencia de 200 mM NaCl. La producción de semilla y calidad de los aceites no se ven afectados por el crecimiento en 200 mM NaCl. Acumulación de altas concentraciones de sal en hojas, pero no en el fruto.	5, 174, 175
<i>SOS1</i>	Antiportador de Na ⁺ /H ⁺ de membrana plasmática	<i>A. thaliana/ A. thaliana</i>	Mayor sobrevivencia de plantas, producción de semillas, crecimiento de raíz, contenido de proteínas y de clorofila.	131
<i>AVP1</i>	H ⁺ -ATPasa vacuolar (H ⁺ -pirofosfatasa)	<i>A. thaliana/ A. thaliana</i>	Crecimiento en 250 mM NaCl, mayor acumulación de sodio en hojas, sobrevivencia y desarrollo normal después de rehidratar plantas en sequía.	45
<i>HAL1</i>	Gen de halotolerancia	<i>S. cerevisiae/ Cucumis melo</i>	Menor reducción en el crecimiento de tallos cultivados <i>in vitro</i> comparado con la silvestre en presencia de 0.17 M NaCl	12, 124

* Abreviaciones- TRC: tasa relativa de crecimiento, PEG: polietilenglicol, CRA: contenido relativo de agua, EUA: eficiencia en el uso de agua, EL₅₀: temperatura que causa un 50% de pérdida de electrolitos.

IV. PROTEÍNAS DE EMBRIOGÉNESIS TARDÍA

Entre las proteínas que se sintetizan en respuesta a déficit hídrico se encuentran las denominadas proteínas LEA, que también se expresan de manera abundante durante la fase tardía de la embriogénesis, cuando inicia la desecación de la semilla. Estas proteínas fueron caracterizadas por primera vez en algodón y, posteriormente se aislaron de otras especies vegetales, agrupándolas en cinco familias de acuerdo a la similitud estructural y homología de secuencias (Dure, 1993). Como características unificadoras comparten un alto índice de hidrofiliidad (>1) y un contenido elevado de glicinas (>6%); cabe mencionar que a pesar de que la homología de secuencias no está conservada entre familias, sí lo está entre los miembros de una misma familia. Se ha encontrado que otros organismos, como bacterias, levaduras (Garay-Arroyo *et al.*, 2000) y nemátodos (Browne *et al.*, 2002), poseen proteínas con características fisicoquímicas similares, por lo que se ha propuesto que las proteínas LEA formen parte de un subgrupo dentro del grupo de las “hidrofilinas” que incluye organismos eucariontes y procariotes (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). Recientemente se desarrolló un algoritmo informático denominado POPP (por Protein or Oligonucleotide Probability Profile) que compara a las proteínas basándose en la similitud de sus composiciones peptídicas y las clasifica, con base en la sub- o sobre- representación de aminoácidos particulares dentro de la secuencia proteica, en 4 familias y 8 superfamilias (Wise & Tunnacliffe, 2004). Esta última clasificación, al no tomar en cuenta las características estructurales de las familias y la homología de secuencias dentro de cada familia, reagrupa de manera totalmente diferente a las proteínas LEA y podría dificultar el análisis de su función biológica.

De tal manera, la clasificación que se seguirá en este trabajo, es la propuesta por Dure (1993), que las divide en diferentes familias, basándose en la similitud de estructuras y conservación de dominios o motivos que distinguen a cada una de ellas. Los miembros de la familia 1 (D-19) son de bajo peso molecular, altamente homólogas entre sí, con glicinas (16-21% de la composición total) dispersadas a lo largo de toda la proteína, por lo que adoptan estructuras secundarias flexibles y poseen al menos un motivo conservado de 20 residuos que se repite en tándem a lo largo de la proteína. La proteína EM de trigo representa a este grupo, del que se han encontrado homólogos en diversas especies vegetales. La familia 2 (también conocidas como dehidrinas o D-11) es la mejor estudiada y está compuesta de muchos miembros que

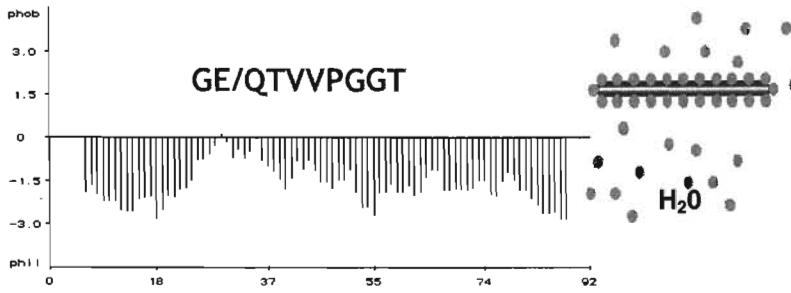
responden a sequía, a salinidad y a bajas temperaturas, son de tamaño variable (14-150 KDa) y poseen al menos tres motivos estructurales representados diferencialmente entre las proteínas de la familia: 1) un motivo en la región amino-terminal, cuya secuencia consenso es (V/T)DEYGNP; 2) en el extremo carboxilo el segmento K, compuesto de 1 a 3 motivos repetidos en tándem de 15 residuos, rico en lisinas, cuya secuencia consenso es EKKGIMDKIKEKLPG. Se predice que este segmento forma α -hélices anfipáticas y que puede tener interacciones hidrofóbicas con proteínas parcialmente desnaturizadas y membranas; 3) un motivo rico en serinas, de 6 a 9 residuos fosforilables contiguos, como se ha demostrado en el caso de RAB17 de maíz (Goday *et al.*, 1994). Las proteínas de la familia 3 (D-7) comparten un dominio de 11 residuos, conservado y repetido en tándem a lo largo de la proteína de 5 a 13 veces, lo cual hace que tengan tamaños muy variables. Estos onceámeros pueden formar α -hélices anfipáticas con la posibilidad de interacciones intra e intermoleculares. Las de la familia 4 (D-113) son de tamaño variable, ricas en glicinas, treoninas y, a diferencia de otras familias, en alaninas. En embriones de algodón están distribuidas uniformemente en todas las células en una concentración de 0.3 mM (Roberts *et al.*, 1993). Según las predicciones basadas en su secuencia de aminoácidos poseen dos dominios, uno en la región N-terminal (60 a 80 aminoácidos) que presenta una elevada homología de secuencia entre los miembros de la familia y forma una α -hélice anfipática y otro, con menor homología de secuencia, que tiene estructura aleatoria y varía mucho en tamaño (Dure, 1993; Ingram & Bartels, 1996). La familia 5 la integran dos proteínas de algodón y otras proteínas relacionadas a éstas en otras especies, que, a diferencia de otras proteínas LEA, se acumulan abundantemente en hojas de plantas estresadas. Se les conoce como LEA atípicas, ya que no presentan el grado de hidrofiliidad ni la composición general de aminoácidos que caracteriza a las demás proteínas LEA (Galau *et al.*, 1993). La familia 6 (LEA-18), descrita más recientemente, está compuesta por proteínas altamente hidrofílicas que se localizan en el citoplasma y en el núcleo. En el caso de la PvLEA18, se ha propuesto que responde al estatus hídrico de la planta durante el desarrollo, ya que se expresa no sólo en plantas expuestas a estrés hídrico sino también en las regiones de crecimiento de plantas bien irrigadas (Colmenero-Flores *et al.*, 1999). Para cada una de las familias LEA, se muestran en la Figura 4 las gráficas de hidrofiliidad

representativas, las estructuras secundarias que se predice que forman y los motivos conservados que se han encontrado para cada familia.

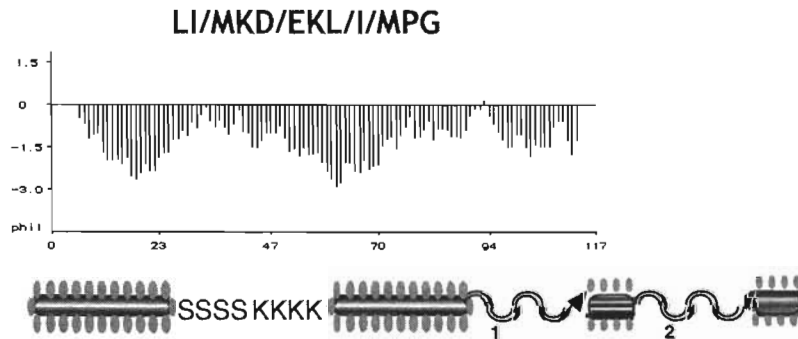
La conservación de dominios en los miembros de las diferentes familias de proteínas LEA, la elevada correlación entre los patrones de acumulación de transcritos y proteínas en condiciones de déficit hídrico, y en particular, su acumulación en etapas del desarrollo de la planta tolerantes a la deshidratación como son las semillas, sugiere su papel fundamental en la tolerancia a la desecación. Aunque no se tiene evidencia experimental directa de la función biológica de estas proteínas, se ha sugerido que su conformación no globular y su gran hidrofiliidad, permitiría su interacción con el agua, reteniéndola en tejidos sujetos a estrés hídrico (McCubin & Kay, 1985). También podrían actuar como secuestradores de iones, así como creando ambientes de “solvatación” o hidratación preferencial para proteger estructuras citosólicas, estabilizando membranas y macromoléculas en los embriones durante la fase de desecación de la semilla (Ingram & Bartels, 1996; Garay-Arroyo *et al.*, 2000, Hoekstra *et al.*, 2001).

El paradigma de la relación estructura-función en proteínas que no poseen una estructura secundaria rígida, como es el caso de las proteínas LEA, ha atraído la atención de numerosas investigaciones en el campo de la biofísica (Uversky, 2002a). La existencia de proteínas flexibles que son biológicamente activas, cuestiona la suposición de que se requiere de una estructura tridimensional rígida para el funcionamiento correcto de las proteínas. Las características estructurales que hacen únicas a este tipo de proteínas son, entre otras: una baja compactación, ausencia de globularidad, bajo contenido de estructuras secundarias y una gran flexibilidad (Tompa, 2002, Uversky, 2002b). Se ha sugerido que esta flexibilidad puede representar una ventaja funcional en condiciones fisiológicas, que les permitiría interactuar con diferentes blancos. Por otra parte, también se ha observado que puede haber transiciones de estructura flexible a una estructura secundaria ordenada al interactuar con su blanco, además de que se ejerce un control más preciso en la termodinámica del proceso de unión, logrando así regular varios procesos celulares (Wright & Dyson, 1999). Existen numerosos estudios donde se han observado transiciones en la estructura de proteínas flexibles, debido a la temperatura, pH y iones (Uversky, 2002b). Por ejemplo, se ha comprobado por métodos espectroscópicos que una proteína de soya de la familia LEA1, presenta transiciones de estructura en la

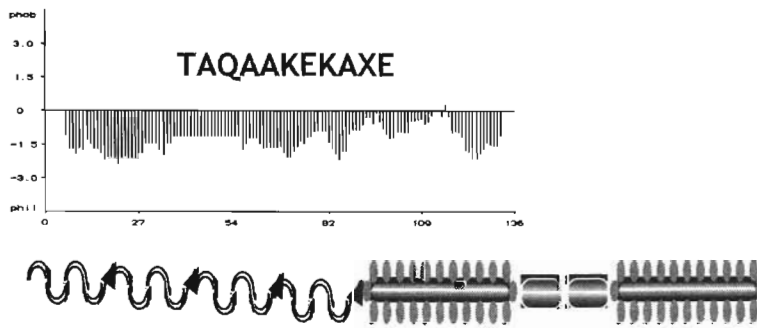
LEA1



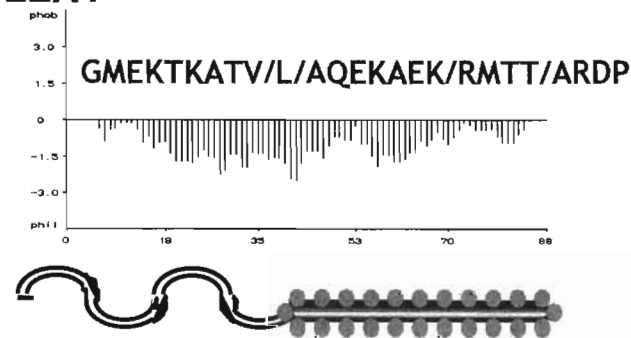
LEA2



LEA3



LEA4



LEA6

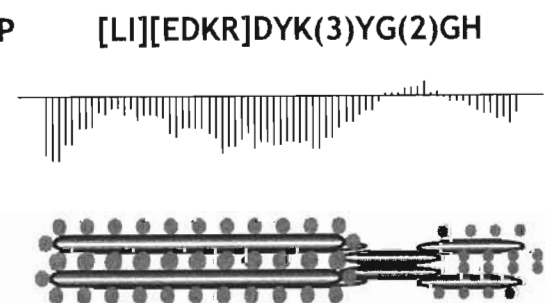


Figura 4. Gráficas de hidrofiliidad representativas, estructura secundaria predicha y motivos conservados para las principales familias de proteínas LEA.

conformación de hélice extendida o tipo poli-L-prolina conforme disminuye la temperatura (Soulages *et al.*, 2002). En otros organismos también se han detectado transiciones en la conformación de proteínas en respuesta a estrés, ya que una proteína similar a proteínas LEA de la familia 3 (AavLEA1) en el nemátodo *Aphelenchus avenae*, cambia de su estado nativo, sin plegamiento, a una estructura ordenada de α -hélice y posiblemente forma estructuras tipo “coiled-coil” en respuesta a la desecación (Goyal *et al.*, 2003). El nemátodo entomopatógeno *Steinernema feltiae* es un organismo anhidrobiótico, es decir, que puede pasar por un estado de dormancia reversible, durante el cual sufre una pérdida del 95 a 98 % del agua corporal. En individuos juveniles de esta especie que han perdido alrededor del 30% de su contenido inicial de agua, la proteína Desc47 se acumula alrededor de 10 veces. Se identificó un péptido de 21 residuos dentro de la proteína similar a la COR14B de trigo (Solomon *et al.*, 2000).

IV. 1 Sobre-expresión de genes que codifican para proteínas tipo LEA

Existe una elevada correlación de la acumulación de estas proteínas ante situaciones de déficit hídrico, ya sea impuestas durante el desarrollo (embriogénesis) o durante el crecimiento vegetativo. Su posible papel en la respuesta adaptativa de las plantas a la limitación de agua se ve apoyado por experimentos de sobre-expresión de algunos genes *LEA* en plantas y en levaduras. La sobre-expresión del gen *HVA1* de cebada, que codifica para una proteína LEA3, aumenta la tolerancia de las plantas de arroz a deshidratación y salinidad (Xu *et al.*, 1996; Babu *et al.*, 2004), mientras que su sobre-expresión en trigo incrementa la productividad en biomasa y eficiencia en el uso de agua bajo condiciones de estrés hídrico (Sivamani *et al.*, 2000). La proteína LE25 de tomate, de la familia 4, aumenta la tolerancia a salinidad y congelamiento cuando el gen que la codifica se sobre-expresa en levadura (Imai *et al.*, 1996). Se ha reportado la presencia de la proteína EM en plántulas de trigo resistentes a desecación (Ried & Walker-Simmons, 1993) y se ha observado que la expresión heteróloga del gen *EM* en levadura, promueve su crecimiento en presencia de una variedad de compuestos osmóticamente activos (NaCl 1M, KCl 1M y sorbitol 1.5 M) por lo que se propone un papel de osmoprotector (Swire-Clark & Marcotte, 1999). La sobre-expresión de los genes que codifican para las proteínas PMA80 y PMA1959 provenientes de plantas de trigo en arroz, otorgan una mayor integridad a membranas en tratamientos de estrés por alta salinidad, y las plantas muestran una mayor

acumulación de biomasa y recuperación después de estar expuestas a tratamientos de sequía y alta salinidad (Cheng *et al.*, 2002). La expresión constitutiva de genes *COR* incrementa la tolerancia de cloroplastos al congelamiento *in vivo*, como el caso del gen *COR15A* (Steponkus *et al.*, 1998), pero el efecto de este mismo gen no es significativo en la sobrevivencia de plantas completas durante congelamiento (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998). La expresión constitutiva de múltiples genes de respuesta a estrés, entre ellos los relacionados a genes *LEA*, como *RD29A*, *COR6.6*, *COR15A*, al ser activados por la sobre-expresión de los genes que codifican para factores de transcripción (CBF1/DREB1A, CBF3), correlaciona con la tolerancia a sequía, salinidad y congelamiento en *Arabidopsis* (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998; Kasuga *et al.*, 1999, Gilmour *et al.*, 2000); así como con la tolerancia a sequía en trigo (Pellegrineschi *et al.*, 2004). La expresión constitutiva de una proteína tipo *LEA* de trigo (WCS-19) localizada a cloroplastos, incrementa la tolerancia a congelamiento en plantas de *Arabidopsis* (Ndong *et al.*, 2002). Lo anterior sugiere que los productos de estos genes, al igual que las diferentes familias de proteínas *LEA*, podrían actuar de manera sinérgica para incrementar la tolerancia al déficit hídrico. La Tabla 1 muestra los genes que se han sobre-expresado en diferentes especies vegetales, así como el fenotipo de las plantas transgénicas en respuesta a varios tipos de estrés.

IV.2 Análisis funcional de hidrofílinas en experimentos *in vitro*

Con la finalidad de profundizar en el posible papel protector de las hidrofílinas durante el déficit hídrico, en nuestro laboratorio se estableció un ensayo de deshidratación parcial *in vitro* en el cual se miden las actividades enzimáticas de la malato deshidrogenasa (MDH) y la lactato deshidrogenasa (LDH) en presencia o ausencia de una hidrofílina (Reyes *et al.*, 2004). La cantidad de agua que queda disponible en estos ensayos (1%) está dentro del intervalo en el que los organismos sensibles a la desecación responden a un déficit hídrico severo (Hoekstra *et al.*, 2001). Entre las proteínas seleccionadas, las dehidrinas DSP16 y ERD10 (familia LEA2), la AtLEA76 (familia LEA-3) y la AtD-113 (AtLEA4-5), así como las hidrofílinas YCIG de *E. coli* y la SIP18 de *S. cerevisiae*, mostraron una mayor protección de la actividad enzimática comparado con la PvLEA-18 (familia LEA-6) y otras proteínas no relacionadas a estrés, como la RNasa A, β -lactoglobulina y α -cristalina. Por otra parte, se determinó que la pérdida de actividad de estas enzimas correlaciona con cambios conformacionales ligeros que permiten la exposición de superficies

hidrofóbicas durante la remoción parcial de agua. Estos cambios conformacionales se midieron en un ensayo fluorométrico utilizando ANS (1-anilinaftaleno-8-sulfonato), un fluoróforo cuya emisión a 460 nm incrementa cuando se une a grupos hidrofóbicos. Cuando la deshidratación ocurre en presencia de una hidrofilina (DSP16, SIP18) los niveles de fluorescencia son muy similares a los de muestras que no estuvieron expuestas a sequía. El uso de un agente entrecruzador permitió detectar la interacción de una hidrofilina (SIP18) con ambas enzimas, indicando que la interacción proteína-proteína forma parte del mecanismo de protección. Los resultados sugieren que el mecanismo de protección involucra la organización de moléculas de agua y la interacción directa entre proteínas para prevenir cambios estructurales en la enzima que modifican su estructura terciaria y su actividad (Reyes *et al.*, 2004).

V. LA INTERFERENCIA DE RNA (RNAi) COMO MECANISMO DE SILENCIAMIENTO DE GENES

Una de las metodologías de genética reversa que ha tenido un gran auge en estos últimos años para conocer la función de genes es el mecanismo de interferencia de RNA (RNAi), es decir, el silenciamiento de genes por medio de la degradación post-transcripcional del RNA mensajero que codifican (mecanismo conocido también como silenciamiento post-transcripcional de genes, PTGS o interferencia de RNA de doble cadena). En esta tesis se utilizó este mecanismo como parte de las estrategias para el análisis funcional de las proteínas LEA4, ya que el análisis por pérdida de función es una herramienta que no se ha aprovechado para el estudio de las proteínas LEA.

El PTGS es un mecanismo que tiene como resultado la degradación específica de una población de RNAs homólogos al RNA interferente (Vaucheret *et al.*, 2001). El mecanismo fue descubierto por primera vez en plantas transgénicas que expresaban copias extra de un gen endógeno y se le llamó co-supresión, debido a que se observó la degradación de los mensajeros codificados por el gen endógeno y el transgen, dando como resultado un fenotipo de pérdida de función (Napoli *et al.*, 1990). Posteriormente, se encontró que este proceso también ocurre de manera similar en otros eucariotes como ciliados, hongos y en diferentes clases de animales como nemátodos y mamíferos (Tijsterman *et al.*, 2002). En los sistemas de silenciamiento de estos organismos, un componente clave involucra moléculas de RNA de doble cadena (dsRNA), que pueden ser generadas por RNA polimerasas dependientes de RNA

producidas por el hospedero, por virus (Dalmay *et al.*, 2000; Mourrain *et al.*, 2000; Vance & Vaucheret, 2001) o por la transcripción de secuencias invertidas repetidas (Waterhouse *et al.*, 1998; Chuang & Meyerowitz, 2000; Escobar *et al.*, 2001); el dsRNA es degradado a fragmentos de 21-26 nucleótidos (denominados siRNA), que se postula que actúan como guías para la maquinaria de degradación, de la cual también forma parte una ribonucleasa de varias subunidades (RISC, por RNA Induced Silencing Complex) que degrada RNAs con homología de secuencia al dsRNA, la especificidad se logra por medio del apareamiento de bases entre el siRNA y la secuencia blanco (Hamilton & Baulcombe, 1999; Zamore *et al.*, 2000; Zamore, 2001). En el caso de las plantas, el mecanismo de silenciamiento actúa también a nivel transcripcional y está relacionado con modificaciones en el DNA, por ejemplo, metilación. Por otra parte, el silenciamiento no es autónomo de una célula: puede ser transmitido de manera sistémica a toda la planta y debe involucrar una señal, desconocida hasta el momento, que se mueva a través de plasmodesmos y el sistema vascular, y que se piensa incluye un componente de ácido nucleico para asegurar la especificidad de secuencia (Mlotshwa *et al.*, 2002). Una señal similar puede existir en *Caenorhabditis elegans*, en el cual, el mecanismo de silenciamiento de RNA también se puede inducir localmente para extenderse posteriormente a otras partes del organismo (Fire *et al.*, 1998). Recientemente se ha clasificado a los siRNA en dos clases: una de 21-22 nucleótidos que dirige la degradación secuencia-específica de RNA mensajero y otra de 24-26 nucleótidos que correlaciona con el silenciamiento sistémico y la metilación de DNA (Hamilton *et al.*, 2002). Se han asignado varias funciones para el silenciamiento de RNA, como parte de la protección adaptativa en contra del ataque por virus, defensa en contra de elementos móviles de DNA, degradación de RNA aberrantes y en la regulación de expresión genética durante el desarrollo (Tijsterman *et al.*, 2002).

Según lo reportado en la literatura, la eficiencia de silenciamiento de genes utilizando esta metodología puede alcanzar niveles cercanos al 100% y con una elevada especificidad de secuencia, de tal manera que genes homólogos hasta en un 80% no son afectados (Schweizer, *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2000), lo cual permitiría anular de manera específica la producción de proteínas de una familia. Debido a que existen varias familias de proteínas LEA en una misma planta, podría haber redundancia funcional entre los miembros de las diferentes familias; sin embargo, a la fecha no existen reportes de análisis con mutantes de toda una familia de estas

proteínas, por lo que sería conveniente abordar un estudio mediante este enfoque (Wang & Waterhouse, 2001). Aún cuando en plantas no hay evidencias provenientes del análisis de mutantes en genes *LEA*, recientemente se ha reportado que la inactivación de genes que codifican para proteínas homólogas a LEAs (hidrofilinas) en una bacteria (*Deinococcus radiodurans*) provoca un fenotipo de sensibilidad a la desecación (Battista *et al.*, 2001). Por otra parte, la delección del gen *rmf* de *Escherichia coli*, el cual codifica para una hidrofilina, resulta en un fenotipo osmosensible (Garay-Arroyo *et al.*, 2000).

ANTECEDENTES

Dado que se conoce muy poco acerca de la función de estas proteínas en relación con su papel en la respuesta adaptativa al déficit hídrico, se decidió abordar este problema utilizando como modelo a la familia de proteínas LEA4. La secuencia completa del genoma de *Arabidopsis thaliana*, permite deducir todos los miembros que conforman a las familias de hidrofilinas LEA. En nuestro laboratorio se rastrearon las secuencias con homología a proteínas LEA identificadas en otras especies vegetales y se encontraron los miembros de cada una de las familias LEA, siendo notable que en la familia 4 existen sólo tres miembros, de los cuales, la proteína AtLEA4-5 (ya que el gen que la codifica se encuentra en el cromosoma 5) se acumula en respuesta a déficit hídrico en tejidos vegetativos en otras especies de plantas (Campos, F., datos no publicados).

Dado que la familia LEA4 posee pocos miembros, nos pareció un buen candidato para llevar a cabo análisis por ganancia y pérdida de función, minimizando la posible redundancia funcional que se ha observado en familias multigénicas. Este tipo de estudio se puede hacer en *Arabidopsis* debido a la versatilidad de metodologías que se pueden aplicar a esta planta modelo y que no están disponibles para plantas cultivadas. En cuanto a los otros dos miembros que conforman la familia LEA4 en *Arabidopsis*, están codificados por los genes *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2*, localizados en los cromosoma 1 y 2, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por estos genes son homólogas a la AtLEA4-5, pero son más pequeñas en la región en la que se predice una estructura aleatoria.

proteínas, por lo que sería conveniente abordar un estudio mediante este enfoque (Wang & Waterhouse, 2001). Aún cuando en plantas no hay evidencias provenientes del análisis de mutantes en genes *LEA*, recientemente se ha reportado que la inactivación de genes que codifican para proteínas homólogas a LEAs (hidrofilinas) en una bacteria (*Deinococcus radiodurans*) provoca un fenotipo de sensibilidad a la desecación (Battista *et al.*, 2001). Por otra parte, la delección del gen *rmf* de *Escherichia coli*, el cual codifica para una hidrofilina, resulta en un fenotipo osmosensible (Garay-Arroyo *et al.*, 2000).

ANTECEDENTES

Dado que se conoce muy poco acerca de la función de estas proteínas en relación con su papel en la respuesta adaptativa al déficit hídrico, se decidió abordar este problema utilizando como modelo a la familia de proteínas LEA4. La secuencia completa del genoma de *Arabidopsis thaliana*, permite deducir todos los miembros que conforman a las familias de hidrofilinas LEA. En nuestro laboratorio se rastrearon las secuencias con homología a proteínas LEA identificadas en otras especies vegetales y se encontraron los miembros de cada una de las familias LEA, siendo notable que en la familia 4 existen sólo tres miembros, de los cuales, la proteína AtLEA4-5 (ya que el gen que la codifica se encuentra en el cromosoma 5) se acumula en respuesta a déficit hídrico en tejidos vegetativos en otras especies de plantas (Campos, F., datos no publicados).

Dado que la familia LEA4 posee pocos miembros, nos pareció un buen candidato para llevar a cabo análisis por ganancia y pérdida de función, minimizando la posible redundancia funcional que se ha observado en familias multigénicas. Este tipo de estudio se puede hacer en *Arabidopsis* debido a la versatilidad de metodologías que se pueden aplicar a esta planta modelo y que no están disponibles para plantas cultivadas. En cuanto a los otros dos miembros que conforman la familia LEA4 en *Arabidopsis*, están codificados por los genes *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2*, localizados en los cromosoma 1 y 2, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de las proteínas codificadas por estos genes son homólogas a la AtLEA4-5, pero son más pequeñas en la región en la que se predice una estructura aleatoria.

Aunque en *Arabidopsis* existen bibliotecas de mutantes por inserciones de T-DNA, en una búsqueda *in silico* realizada al inicio de este trabajo no se encontró ninguna inserción en la región codificante de los genes de esta familia. Así mismo, debido a que el cDNA del gen *AtLEA4-5* ya se tenía clonado en el laboratorio, e incluso se contaba con los anticuerpos policlonales para la detección de la proteína, se iniciaron los estudios con este gen, con la finalidad de realizar posteriormente el análisis con las otras dos proteínas. En una reciente búsqueda en los bancos de mutantes, se encontró una inserción en la región codificante del gen *AtLEA4-1*, pero esta tesis se limitó al análisis funcional del producto del gen *AtLEA4-5*, en experimentos tanto de sobre-expresión como de silenciamiento del gen referido.

HIPÓTESIS

Las hidrofílicas de la familia LEA4 de *Arabidopsis thaliana* participan en la respuesta adaptativa ante déficit hídrico, de tal manera que su silenciamiento provocará un fenotipo de sensibilidad, en tanto que la sobre-expresión de uno o todos los genes que las codifican producirá un fenotipo de tolerancia.

OBJETIVO GENERAL

Llevar a cabo la caracterización de los patrones de expresión de los transcritos de la familia *AtLEA4* y la proteína *AtLEA4-5*, así como realizar un análisis funcional con dicha proteína en plantas de *Arabidopsis thaliana*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar y clonar los genes *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2* a partir de una biblioteca de cDNA de *Arabidopsis*, de donde previamente fue clonado el gen *AtLEA4-5*.
- Analizar los patrones de acumulación de los transcritos correspondientes a los genes *AtLEA4-1*, *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5*, así como los patrones de acumulación de la proteína *AtLEA4-5* durante la embriogénesis y en tejido vegetativo en diferentes etapas del desarrollo bajo condiciones de irrigación óptima y de déficit hídrico.
- Obtener plantas transgénicas que expresen una construcción para dirigir el silenciamiento de uno y/o todos los genes de la familia *AtLEA4* mediante el método de interferencia de RNA. Se cuenta con las semillas de plantas transgénicas que sobre-expresan el gen *AtLEA4-5*, de las cuales se seleccionarán plantas homocigotas para el transgen.
- Realizar un análisis fenotípico de plantas transgénicas que sobre-expresen el gen *AtLEA4-5* y compararlo con el de plantas silenciadas para el mismo gen.

MATERIALES Y MÉTODOS

I. Análisis bioinformático de la familia de proteínas LEA4: clasificación, motivos conservados y predicción de estructura secundaria.

Para llevar a cabo este análisis se rastrearon secuencias de cDNAs correspondientes a proteínas homólogas a la AtLEA4-5 en los bancos de ESTs de las especies vegetales disponibles utilizando el algoritmo tblastn (NCBI BLAST, Protein query vs. Translated database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Se seleccionaron únicamente las secuencias que correspondieran a proteínas completas, además se verificó que cada proteína tuviera una predicción de estructura secundaria semejante a los miembros de la familia LEA4 reportados, es decir, que tuviera una región de α -hélice seguido de una región de estructura aleatoria. Se utilizaron los programas Protean (DNASTar, Inc.) y PSIPRED (McGuffin *et al.*, 2000) para la predicción de estructuras secundarias.

Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias, utilizando la región más conservada de la proteína, que corresponde a la región de α -hélice, con el programa T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000) y posteriormente se revisó y editó el alineamiento con el objetivo de maximizar el alineamiento de las secuencias. Posteriormente, el alineamiento editado que estaba en formato MSF se convirtió al formato Phylip con el programa Readseq (<http://bimas.cit.nih.gov/molbio/readseq/>) para que las secuencias editadas pudieran ser reconocidas en el programa de análisis filogenético Puzzle. Este programa construye árboles filogenéticos basándose en el método de “Máxima probabilidad” (Strimmer & von Haeseler, 1996). La estimación de los parámetros se basa en el método de “Agrupamiento de vecinos”, con 1000 pasos y con el modelo de sustitución de aminoácidos BLOSUM 62 (Hennikoff-Hennikof, 1992). Se eligió como grupo externo la secuencia del pino *Pseudotsuga mensiezii*, debido a que es la más lejana evolutivamente con respecto a las secuencias de angiospermas analizadas. Las distancias de las ramas y sus porcentajes de confiabilidad se graficaron con el programa Tree View v1.6.5.

Para resaltar gráficamente las similitudes en las secuencias de proteínas de las diferentes especies, el alineamiento editado se introdujo al programa BOXShade (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Finalmente se buscaron los motivos o firmas conservadas a partir de la secuencia consenso que despliega el

programa BoxShade, confirmándolo con los motivos obtenidos con el programa MEME (SeqWeb, Wisconsin Package), el cual despliega los motivos consenso de secuencias analizadas, así como las matrices de probabilidad de encontrar un determinado aminoácido en una posición dentro del motivo.

II. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Las semillas de plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia) fueron germinadas en un medio de crecimiento (GM) con 4.3 g/L (1 x) de sales Murashige and Skoog (MS, GIBCO/BRL), 1 % de sacarosa, 0.5 g/L de MES (2-(N-Morpholino) ácido etano-sulfónico, Research Organics) y 0.6% de bacto-agar en cajas Petri de 9 cm de diámetro. Previamente a la siembra, las semillas fueron esterilizadas en campana de flujo laminar con etanol absoluto durante 1 minuto y con una solución de hipoclorito de sodio comercial al 40% y tritón al 0.02% durante 8 minutos, se enjuagaron 5 veces con agua estéril. Las semillas se estratificaron a 4°C por 4 días en oscuridad y después se transfirieron a cuartos de crecimiento a 25 °C con un fotoperiodo de 18 h luz/6 h oscuridad iluminadas con luz blanca.

En el caso de semillas transgénicas, éstas se seleccionaron adicionando al medio 50 µg/ml de kanamicina (Sigma). Las plantas que presentan un fenotipo normal de crecimiento llevan el T-DNA que porta el transgen, junto con el gen que confiere resistencia a kanamicina. Para segregar el transgen y producir líneas homocigotos para el mismo, se autofecundaron dos generaciones sucesivas de plantas T_0 .

III. Crecimiento de plantas silvestres y colecta de silicuas para el análisis de los patrones de acumulación de transcritos de la familia *AtLEA4* y la proteína *AtLEA4-5* durante la embriogénesis

Se germinaron semillas de *Arabidopsis* ecotipo Columbia en medio GM y se transplantaron 4 plántulas de 6 días de edad a 3 macetas de 8.5 x 8.5 cm con sustrato Metromix (Hummert) y se mantuvieron en condiciones de irrigación óptima en todo el intervalo de duración del experimento. Se dejaron crecer hasta la etapa de floración, se marcaron las flores en el día de la antesis y posteriormente se colectaron silicuas

de diferentes edades para cubrir todas desde las etapas de formación del embrión hasta llegar a la maduración y desecación de las semillas. Los intervalos seleccionados para el análisis de los patrones de acumulación de transcritos de la familia *AtLEA4* así como los patrones de acumulación de la proteína *AtLEA4-5* durante la embriogénesis fueron: flores en antesis, 1-5 DPA (días post-antesis), 6-10 DPA, 11-15 DPA, 16-20 DPA, 21-24 DPA y semilla seca (post-abcisión). El material vegetal se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -70°C hasta su uso para la extracción de RNA y proteína totales.

IV. Tratamientos de estrés abiótico en plantas de dos semanas y plantas adultas de 6 a 7 semanas de crecimiento

Las etapas de desarrollo de las plantas en estudio corresponden a plantas jóvenes (con hojas cotiledonarias y primeras hojas de la roseta) de 2 semanas de edad, debido a que es una etapa muy sensible a la desecación, donde la sobrevivencia es determinante para el establecimiento de la planta, y plantas adultas (con el eje caulinar recién formado y con los primeros botones florales, de 6 a 7 semanas de edad), ya que se ha visto que en plantas de interés agronómico, esta es una etapa muy sensible a la desecación y determinante en la producción de descendencia de la especie.

Se aplicaron tratamientos de estrés abiótico que inducen la expresión de otras proteínas LEA (Horvath *et al.*, 1993; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1994), así como ensayos de deshidratación para *Arabidopsis* (van der Weele *et al.*, 2000). En los casos donde se indica, las plántulas se cosecharon de las cajas Petri a las dos semanas de edad para transferirlas a los tratamientos de estrés en medio líquido. En campana de flujo laminar se trasplantaron de 20 a 25 plántulas por tratamiento, a cajas Petri de vidrio estériles, de 6 cm de diámetro, con 15 ml de GM líquido (sin bactoagar) con o sin la adición de ácido abscísico (ABA, 100 μ M), polietilenglicol peso molecular 8000 (PEG-8000 25%, Research Organics) o cloruro de sodio (NaCl, 100, 150 y 200 mM, Sigma). Las cajas tenían un soporte de tela plástica para que únicamente quedara en contacto la raíz con el medio líquido. Se incubaron en el cuarto de crecimiento a 25 °C tapadas y con agitación constante durante 8 horas (o el tiempo indicado en el caso de experimentos de cinética de inducción, de 4 a 24 h). También se aplicaron

tratamientos de temperaturas bajas, transfiriendo las cajas Petri en donde fueron crecidas originalmente las plántulas a 25° C, a un cuarto frío a 4° C durante 8 horas.

En el caso de experimentos de sequía con plantas adultas, en nuestro laboratorio se estableció un método en el cual se utiliza un sustrato de muy baja retención de agua (Turface, Hummert), en el que las plántulas crecidas en cajas Petri durante 6 días, se trasplantaron a macetas de 8.5 x 8.5 cm con aproximadamente 250 g de sustrato. El diseño experimental fue de 3 réplicas (macetas) con 4 plantas cada una, tanto para la silvestre como para cada línea transgénica. Las charolas con macetas se colocaron en un cuarto de crecimiento con un fotoperiodo de 18 h luz/6 h oscuridad, iluminadas con luz blanca. Debido a que el sustrato posee muy baja retención de agua, las plantas se tuvieron bien hidratadas hasta alcanzar la edad en la que se aplicó el tratamiento de estrés regándolas siempre a saturación con solución nutritiva (KNO₃ 5mM, KH₂PO₄ 2.5mM pH 5.6, MgSO₄ 2mM, Ca(NO₃)₂ 2mM, Fe-EDTA {ácido tetra-acético etilendiamina, dihidrato} 50 μM y solución de micronutrientes {H₃BO₃ 70 μM, MnCl₂ 14 μM, CuSO₄ 0.5 μM, ZnSO₄ 1 μM, NaMoO₄ 0.2 μM, NaCl 10 μM, CoCl₂ 0.01 μM}).

Una vez que se había desarrollado el primer eje caulinar y antes de haber formado silicuas se iniciaron los tratamientos de sequía, para lo cual se absorbió el exceso de agua de cada maceta con toallas de papel y se registró el peso inicial de cada una. Las macetas se transfirieron a una charola sin agua y se evaluó la pérdida de agua de cada maceta en intervalos de tres días hasta alcanzar porcentajes de pérdida de agua en el sustrato de 80%. También se simuló la falta de disponibilidad de agua en las raíces regando las plantas con 4 litros de PEG-8000 al 25% en lugar de la solución nutritiva, previamente se retiró también el exceso de agua de las macetas y se dejaron en contacto con esta solución durante 2 semanas o hasta observar fenotipos de marchitez en las plantas, agregando 2 litros más de solución en este intervalo de tiempo para mantener la solución siempre en contacto con el sustrato.

Una vez concluidos los tratamientos se congeló el material vegetal en nitrógeno líquido y se almacenaron a -70°C hasta el momento de utilizarlos para la extracción de RNA y proteína total. En el caso de plantas adultas, se separaron las flores, raíces y hojas (hojas de la roseta y tallos de los ejes caulinares).

V. Aislamiento y obtención de sondas correspondientes a los genes *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2*

Para determinar el número de miembros de la familia *AtLEA4* en *Arabidopsis* se llevó a cabo un rastreo de secuencias similares en el banco de datos correspondiente al genoma de *Arabidopsis*. Para ello, se realizó un alineamiento de secuencias con el algoritmo BLAST (tigrblast.tigr.org/er-blast/index.cgi?project=ath1) usando como templatado una proteína representante de la familia LEA 4 de algodón reportada en los bancos de datos (LEA D-113, *Gossypium hirsutum*, NCBI), de lo cual se obtuvo el locus At5g06760, que a su vez fue utilizado como templatado para una nueva búsqueda en el genoma de esta planta. De esta segunda búsqueda se encontraron dos secuencias con un porcentaje de similitud significativo correspondientes a los loci At1g32560 y At2g35300. En la Tabla 2 se muestran los porcentajes de similitud a nivel de aminoácidos de las proteínas codificadas por estos genes, que en adelante se referirán como *AtLEA4-1*, *AtLEA4-2* y *AtLEA4-5*, porque están localizadas en los cromosomas 1, 2 y 5, respectivamente.

PROTEÍNAS	AtLEA4-1 vs. AtLEA4-2	AtLEA4-1 vs. AtLEA4-5	AtLEA4-2 vs. AtLEA4-5
% SIMILITUD	66.7	44.3	40.5
% IDENTIDAD	56.3	32.9	29.7

El cDNA del gen *AtLEA4-5* ya se tenía clonado en el laboratorio, amplificando por PCR con la enzima *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) el marco de lectura abierto (ORF) del gen a partir de una biblioteca de cDNA de plantas de *Arabidopsis thaliana* utilizando los siguientes oligonucleótidos como cebadores en reacciones de PCR: 5'-AAA CCA TGG AGT CGA TGA AAG AAA C-3' y 5'-GCG GTC GAC CCG TTT ATC CAG TAT ATC C-3', utilizando una T_m de 55°C. El cDNA del gen *AtLEA4-1* se amplificó por RT-PCR con la MMLV Reverse Transcriptase (USB) y *Taq* DNA polimerasa utilizando una preparación de RNA total de plantas de *Arabidopsis* ecotipo Columbia de dos semanas de edad, sometidas a un tratamiento de estrés por deshidratación en cámara húmeda (8 h, 25°C). Los oligonucleótidos 5'-AAT CCA TGG AAT CGG CGA AAC AGA TAA GCG ATA TGCC-3' y 5'-GCC GTC GAC CGG ATT AGT AGT GAT GAT GAT TAT GAT-3' permitieron amplificar el ORF completo, utilizando una T_m de 70°C. El producto de PCR se clonó en el vector TOPO (Invitrogen) y se secuenció el inserto (Unidad de

Secuenciación, Instituto de Biotecnología, UNAM). El gen *AtLEA4-2* se amplificó a partir de DNA genómico de plantas de *Arabidopsis* del mismo ecotipo, ya que el gen no posee intrones. Los oligonucleótidos 5'-CGA ATC GAT GTC ATG CGG AGA AGA CGA TGG CAAG3-' y 5'-TCG AAG CTT GAT CTG TCC CGG CGG GTA ATT AGC-3' amplificaron un fragmento de 200 pb, de los 297 pb que constituyen al gen correspondiente, utilizando una T_m de 70°C. Se clonó el producto de PCR correspondiente al fragmento de este gen en el vector TOPO (Invitrogen) para obtener posteriormente su secuencia (Unidad de Secuenciación, Instituto de Biotecnología, UNAM). En todos los casos se realizaron 35 ciclos de amplificación en las reacciones de PCR.

VI. Extracción de RNA y experimentos tipo Northern (hibridación DNA-RNA) y RT-PCR.

Todo el material utilizado en la extracción, cuantificación y separación en geles fue esterilizado dos veces en el autoclave (120 °C, 20 min) y horneado a 80 °C durante 24-48 h. Se extrajo RNA total de flores, silicuas y semillas maduras utilizando el protocolo descrito por Vicent & Delseny (1999). Para la extracción de RNA total de plantas de dos semanas se utilizó el buffer Z6 (Clorhidrato de guanidina 8M, MES 20 mM, EDTA 20 mM y β -mercaptoetanol 50 mM), homogeneizando el tejido congelado con el buffer durante 1-2 minutos, posteriormente se extrajo con un volumen de fenol:cloroformo y se centrifugó a 4°C, se tomó la fase acuosa y se precipitó 2 h a -20 °C con 1/20 vol. ácido acético glacial y 0.7 vol. etanol absoluto. Se centrifugó y lavó la pastilla con etanol al 70%. Se resuspendió en agua y se precipitó toda la noche con cloruro de litio 2 M, al día siguiente se centrifugó y lavó la pastilla dos veces y se resuspendió en agua. Para la extracción de RNA de algunos órganos de plantas adultas (hojas y raíces) se usó Trizol (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor.

Se cuantificó la absorbancia a 260 y 280 nm en el espectrofotómetro y se tomaron alícuotas de 15-20 μ g por muestra para separarlas en geles de formaldehído-agarosa al 1.5%, se lavaron los geles con SSC 10x (1.5 M NaCl, 150 mM citrato de sodio) durante 30 minutos y se transfirieron por capilaridad a membranas de nylon (Hybond N+, Amersham) de 14 a 18 h en presencia de SSC 20X. Las membranas se tiñeron con azul de metileno al 0.03% disuelto en acetato de sodio 0.5M pH 5.2 con la finalidad de verificar que todas las bandas se hubieran transferido correctamente. Se

prehibridaron con 15 ml de PSE 1x (7% SDS, 0.3 M NaH₂PO₄ pH 7.2, 1 mM EDTA) durante 30 min a 65°C, se hibridaron con las sondas de DNA marcadas con α -³²P-dCTP por el método de cebadores al azar (2.5-3 millones de cpm incorporadas en la sonda), previamente las sondas se desnaturalizaron por ebullición o con 250 μ l de 0.1 M NaOH y diluídas en 10 ml PSE 1x. Se hibridaron en condiciones de alta severidad a 65°C durante 14-18 h y, posteriormente, se lavaron las membranas una vez con 0.5 x SSC-0.1% SDS y dos veces en condiciones de alta severidad (0.1 x SSC-0.1% SDS). Las membranas se emplearon para exponer películas Kodak X-Omat durante 3 a 7 días dentro de cassettes con pantalla intensificadora (Amersham) a -70 °C.

Para los análisis tipo RT-PCR se sintetizó el cDNA a partir de 2 μ g de RNA total con un oligonucleótido dT (1 μ g/ μ l) de secuencia 24 (T)TVN en donde V= A/G/C y N= A/G/C/T, se incubó a 72°C/10' y se amplificaron las secuencias poliadeniladas con la enzima MMLV Reverse Transcriptase a 42°C por 60 minutos, se inactivó la enzima incubando la reacción a 72°C durante 10 minutos, posteriormente se tomó una alícuota de 1/20 de la reacción y se agregó al coctel de reacción de PCR con la enzima *Taq* polimerasa y los oligonucleótidos específicos para cada cDNA. Para la *AtLEA4-1* los iniciadores corresponden a los mismos que se utilizaron para la obtención de la sonda correspondiente, mientras que para *AtLEA4-2* la secuencia corresponde a 5'-GCG GGA TCC CTC GAG ATG CAG TCG GCG AAG GAA AAG -3' y 5'-CGA TCT AGA GGT ACC GTT TTA GAT CTG TCC CGG CGG-3' con una T_m de 65°C. Para *AtLEA4-5* la secuencia de los iniciadores fue 5'- GTA GGA TCC CTC GAG ATG CAG TCG ATG AAA GAA ACA GC3-' y 5'-TCG TCT AGA GGT ACC CCG TTT ATC CAG TAT ATC CCC C3-' con una T_m de 55°C. Todos los iniciadores amplifican el ORF completo del cDNA correspondiente, se aplicaron 35 ciclos de amplificación y se cargaron en el gel lo correspondiente a 1/6 de la reacción de PCR. Para el caso único de los análisis RT-PCR de plantas de dos semanas de edad que recibieron tratamientos de ABA y déficit hídrico con PEG, salinidad y frío, se utilizó la enzima SuperScript™ One/Step RT-PCR with Platinum Taq (Invitrogen), a partir de 500 ng de RNA total y con los oligonucleótidos específicos para cada cDNA, utilizando 35 ciclos de amplificación y siguiendo las instrucciones del proveedor.

VII. Caracterización de los patrones de acumulación de los transcritos de la familia *AtLEA4* durante la embriogénesis y en respuesta a déficit hídrico

Una vez que se tenían clonadas las tres sondas de los genes que conforman a la familia *AtLEA4*, se confirmó por experimentos tipo Southern (hibridación DNA-DNA) la especificidad de reconocimiento de cada una con el cDNA correspondiente. Para ello se hizo una digestión con *EcoRI* para liberar los insertos del vector TOPO, en el caso de las sondas para los genes *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2*, y con *NcoI/SalI* en el caso del gen *AtLEA4-5*, cuyo cDNA está clonado en el vector pBluescriptKS+ (Stratagene). Los productos de la digestión se cargaron por triplicado y se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5% y posteriormente se transfirieron a una membrana de nylon (Hybond N+, Amersham). Los productos de las digestiones presentes en esta membrana se hibridaron con cada una de las sondas por separado, la preparación de las sondas y las condiciones de hibridación (en alta severidad) son semejantes a las descritas en la sección anterior.

Se prepararon extractos de RNA total obtenidos de flores, silicuas en diferentes etapas de la embriogénesis y semillas secas y se analizaron mediante experimentos tipo RT-PCR. Para determinar la inducción por diferentes tipos de estrés abiótico, se utilizaron plantas de dos semanas de crecimiento en cajas Petri que fueron sometidas a tratamientos durante 8 horas en las condiciones de estrés descritas anteriormente. También se extrajo RNA total de plantas adultas sometidas a diferentes grados de déficit hídrico. Se tomaron muestras a los 2, 4, 6, 8 y 10 días a partir de la fecha en que se dejaron de regar las plantas (entre 20 y 80% de pérdida de agua del sustrato) y se separaron en raíces, hojas y flores antes de congelarlas en nitrógeno líquido. En los experimentos de inducción por estrés, se analizaron los patrones de acumulación de transcritos mediante experimentos tipo Northern para el caso del gen *AtLEA4-5*, y por RT-PCR para los genes *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2*, ya que no se logró detectar a estos dos últimos mediante experimentos tipo Northern utilizando las mismas condiciones de hibridación con las cuales se detectó el gen *AtLEA4-5*, ni con tiempos mayores de exposición de la película.

VIII. Extracción de proteína y experimentos tipo Western (Interacción proteína-anticuerpo)

Con el objetivo de optimizar la obtención de proteínas tipo LEA se utilizaron extractos protéicos totales de plantas silvestres de dos semanas de edad, ensayando tres métodos de extracción de proteína total de tejido vegetativo y dos buffers de solubilización reportados para otras proteínas, incluyendo proteínas LEA (Hurkman & Tanaka, 1986; Colmenero-Flores *et al.*, 1999). El método que dio mejores resultados fue el reportado por Hurkman & Tanaka (1986) con algunas modificaciones. El tejido congelado con nitrógeno líquido se homogenizó en presencia de buffer (sacarosa 0.7 M, Tris Base 0.5 M, HCl 30 mM, β -mercaptoetanol 2% y 12 mg/ml PVPP, polivinilpirrolidona) y fenol saturado en agua, en proporción de 1/3 buffer: 2/3 fenol. Se centrifugó y se tomó la fase orgánica, extrayendo una vez más con la misma proporción de buffer (sin PVPP) y fenol, la fase orgánica se centrifugó y se precipitó toda la noche a -20 °C utilizando 3 volúmenes de acetato de amonio 0.1 M en metanol. Se centrifugó 15 minutos y la pastilla resultante se lavó con acetona al 80% y se resuspendió en buffer Tris 20 mM, NaCl 50 mM y SDS 0.2%. La cuantificación de proteína se realizó por el método de Bradford (Bio-Rad) utilizando como referencia una curva estándar de albúmina de suero bovino. La concentración de SDS presente en las muestras no interfiere con el reactivo de Bradford, según instrucciones del proveedor.

Debido al tamaño de la proteína (16.2 KDa), se decidió utilizar geles de poliacrilamida al 16.5% en presencia de un buffer Tris 0.1 M, Tricina 0.1 M y SDS 0.1%, que permiten resolver proteínas en un intervalo de 1 a 100 KDa (Schägger & von Jagow, 1987). Se cargaron alícuotas de 10-20 μ g de proteína total y se separaron por electroforesis a 30 mA. Se transfirieron las proteínas en líquido (buffer Tris 25 mM, glicina 0.2 M, metanol 20% v/v) a membranas de nitrocelulosa (Hybond C, Amersham) durante 2 h a 100 V (4 °C). Se verificó la transferencia tiñendo la membrana con rojo de Ponceau, se lavó el colorante con PBS 1x (NaCl 0.27 M, KCl 5.4 mM, Na_2HPO_4 20 mM, KH_2PO_4 3.5 mM) y se bloqueó la membrana 2 h a temperatura ambiente en 10 ml de solución PBSL (PBS1 X adicionada con 5% de leche), se incubó toda la noche en 10 ml de PBSL con los anticuerpos (inmunopurificados o directamente del suero, ver más adelante) a 4°C y al día siguiente se lavó 3 veces con PBS 1x durante 10 minutos a temperatura ambiente con agitación constante antes de agregar el segundo

anticuerpo (0.3 µg/ml peroxidasa anti-conejo, Zymed) incubando 2 h a temperatura ambiente. Se lavó 3 veces más con PBS 1x y se incubó con el sustrato de la peroxidasa (SuperSignal West Pico, Pierce) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizó película Kodak X-Omat para detectar la señal de peroxidasa, exponiendo las películas de 15 segundos a 5 minutos dentro de cassettes con pantalla intensificadora (Amersham).

IX. Caracterización de los patrones de acumulación de la proteína AtLEA4-5 durante la embriogénesis y en respuesta a déficit hídrico

Se contaba con el cDNA correspondiente al ORF del gen *AtLEA4-5* clonado en un vector de expresión para bacterias (pTrc99A, Amann *et al.*, 1988) bajo el control del promotor del gen *lacZ* y con un marcador de selección que confiere resistencia a ampicilina. Se indujo la expresión de la proteína AtLEA4-5 con 1mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) aplicado a un cultivo de bacterias (*E. coli*) transformadas con la construcción y se enriqueció la fracción no coagulable sonicando las bacterias durante 10 minutos con ciclos de 30 segundos cada uno y posteriormente se hirvió durante 10 minutos (Jepson & Close, 1995). Se contaba con anticuerpos policlonales dirigidos contra la proteína AtLEA4-5, de los que se determinó la sensibilidad y especificidad de reconocimiento. Se titularon los anticuerpos mediante un experimento tipo Western incubando diluciones del suero (1:500, 1:1000 y 1:2000) con diferentes concentraciones del extracto de proteína enriquecido por calor (10, 20, 50 y 100 ng). Para determinar si los anticuerpos reconocen específicamente a la proteína AtLEA4-5 se extrajo proteína total de semillas maduras de *A. thaliana*. Dado que los ESTs reportados para los tres genes se obtuvieron a partir de RNA de semillas, se espera que las tres proteínas se acumulen en este órgano y, por tanto, ésta fue la fuente para obtener el extracto de proteína total para este análisis. En un experimento tipo Western se observó una sola banda con una masa molecular aparente de 20 KDa correspondiente a la proteína AtLEA4-5.

Debido a que en experimentos iniciales tipo Western realizados con extractos de proteína total correspondientes a cinéticas de inducción con plantas de dos semanas de edad se observaron bandas de peso molecular superior al correspondiente a la proteína de interés y, para detectar la posible formación de oligómeros de la

misma, los anticuerpos se inmunopurificaron del suero siguiendo el método descrito por Lillie & Brown (1987) y se titularon utilizando el mismo procedimiento que en la titulación de anticuerpos sin inmunopurificar, pero en este caso las diluciones utilizadas fueron 1:250, 1:125 y 1:60. Como control de la inmunopurificación se utilizaron extractos vegetales de plantas tratadas con PEG 25% durante 8 horas, en los que ya se había observado la formación de bandas de alto peso molecular al incubar los anticuerpos directamente de una dilución del suero sin inmunopurificar.

Se realizó además un ensayo de competencia utilizando los anticuerpos inmunopurificados en un experimento tipo Western con extractos de proteína total de semillas secas y de plantas de dos semanas de edad tratadas con PEG 25% durante 8 horas. Se eligieron estas dos etapas del desarrollo, ya que se había determinado en los estudios anteriores que eran condiciones en las cuales se acumulaba la proteína abundantemente. En el ensayo de competencia los anticuerpos (en 1 ml de buffer PBSL) fueron incubados con diferentes cantidades de proteína AtLEA4-5 (0, 50 ng, 500 ng y 5 µg) durante toda la noche con agitación suave y posteriormente la mezcla antígeno/anticuerpo se agregó a 9 ml de buffer PBSL y se incubaron con las membranas de nitrocelulosa que tenían los extractos de semillas y plantas tratadas con PEG 25%. Con estos experimentos se pretende demostrar que la proteína AtLEA4-5 es reconocida específicamente por anticuerpos generados contra el antígeno utilizado, en este caso, la proteína recombinante sobre-expresada en *E. coli*.

Una vez determinada la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos purificados se analizaron por experimentos tipo Western los patrones de acumulación de la proteína AtLEA4-5 en extractos de proteína total proveniente de flores, silicuas en diferentes etapas de la embriogénesis y semillas maduras, así como en respuesta a diferentes tipos de estrés abiótico durante 8 horas, utilizando los mismos tratamientos de inducción que se describieron para el análisis de acumulación de transcritos. Se hicieron cinéticas de inducción (4, 8, 12 y 24 hrs) con estos mismos tratamientos. La concentración de PEG-8000 a la que se induce en mayor medida la AtLEA4-5 se determinó aplicando 8 horas el estrés con tres concentraciones de PEG-8000 (12, 18 y 25%).

X. Sobre-expresión del gen *Atlea4-5* en *Arabidopsis thaliana*

Para obtener plantas transgénicas de *Arabidopsis* que sobre-expresaran el gen *AtLEA4-5*, el cDNA correspondiente al ORF para *AtLEA4-5* que se tenía clonado en el vector pBluescriptKS+ en los sitios de restricción *NcoI/SalI* se subclonó en el vector binario (pBin35S-NOS), con un marcador de selección que confiere resistencia a kanamicina. Se transformaron células electrocompetentes de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58/pGV2260) con el vector binario y las bacterias se utilizaron para transformar por infiltración al vacío de 25 plantas adultas de *Arabidopsis* ecotipo Columbia como se describe en Bechtold *et al.* (1993). Se cosecharon semillas de la T₀ y se seleccionaron las plantas transgénicas plaqueando aproximadamente 2000 semillas en un medio con 50 µg/ml de kanamicina. Las plantas resistentes al marcador se trasplantaron a tierra y se dejaron autofecundar para cosechar las semillas de la T₁. Estas se seleccionaron nuevamente en kanamicina y se estimó el número de inserciones del transgen por la segregación del marcador. Se autofecundaron 15 plantas de 5 líneas con segregación de resistencia a kanamicina 3:1 que indicó que tenían sólo una inserción, para obtener cuando menos una planta homocigota para el transgen en la generación T₂ por cada línea, verificándolo también al sembrarlas en kanamicina. Se compararon los niveles de expresión del transgen en las 5 líneas mediante un experimento tipo Northern utilizando plantas de dos semanas de edad crecidas en cajas Petri. También se comprobó por experimentos tipo Western que las 5 líneas expresaran la proteína de manera constitutiva y se compararon los niveles de expresión. Como control para ambos experimentos se utilizaron plantas silvestres.

X. 1 Experimentos de germinación en condiciones de estrés

Con la finalidad de determinar si la sobre-expresión del gen *AtLEA4-5* otorgaba un fenotipo de tolerancia durante el proceso de la germinación con respecto a plantas silvestres, se llevaron a cabo experimentos de germinación en condiciones de estrés. Los experimentos se hicieron en medio GM sólido con la adición de manitol 500 mM o NaCl 200 y 250 Mm.

X.2 Análisis fenotípico de plantas adultas de 6 a 7 semanas de edad sometidas a diferentes severidades de sequía

Para determinar si la sobre-expresión del gen que codifica para la proteína AtLEA4-5 confería una ventaja sobre las plantas silvestres en condiciones de déficit hídrico, se realizaron experimentos para determinar parámetros de importancia fisiológica y agronómica, como son el contenido relativo de agua (CRA), acumulación de biomasa, porcentaje de sobrevivencia y producción de yemas florales después de haber estado sometidas a déficit hídrico severo. Las semillas fueron germinadas *in vitro* en presencia de kanamicina y a los 6 días de edad fueron transplantadas a macetas de 8.5 x 8.5 cm con sustrato Turface. El CRA se definió por la fórmula $(P_f - P_s) / (P_t - P_s)$, en donde P_f es el peso fresco de las plantas, P_s el peso seco después de aplicar calor seco en un horno a 50 °C por 7 días y P_t es el peso turgente de las plantas después de flotarlas de 3 a 6 horas en agua destilada estéril a temperatura ambiente (Tezara *et al.*, 2002). En tres experimentos independientes se analizaron los porcentajes de sobrevivencia de plantas adultas que estuvieron sometidas a niveles severos de sequía (80% de pérdida de agua del sustrato) causada por la falta de riego durante dos semanas. La sobrevivencia fue cuantificada como la capacidad de recuperación (aparición de tejido fotosintético nuevo) después de una semana de rehidratar las plantas con solución nutritiva. También se cuantificó el número de yemas florales por planta. Una vez realizadas estas cuantificaciones se sacaron de las macetas las plantas completas y se colocaron por separado en bolsas de papel para tomar el peso seco después de haberlas colocado en un horno a 50°C por 7 días o a 80°C por 2 días. Adicionalmente se observaron los cambios fenotípicos de plantas adultas crecidas en sustrato Turface y que fueron sometidas a riego con PEG 25% una vez que alcanzaron la madurez, comparando la marchitez de las líneas transgénicas con respecto a las plantas silvestres.

X.3 Análisis estadístico

Para verificar si las diferencias obtenidas entre las diferentes líneas transgénicas con respecto a plantas silvestres eran significativas, se realizaron análisis de varianza (ANOVA de 1 vía) en los datos cuya distribución era normal. Para verificar la normalidad en la distribución de los datos se aplicó la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Adicionalmente se aplicó una prueba de homogeneidad de varianzas, ya que el ANOVA asume que los datos la tienen. Se realizaron comparaciones múltiples entre

líneas con la prueba de Scheffe. Si los datos no presentaban una distribución normal se utilizó estadística no paramétrica, aplicando la prueba de Kruskal-Wallis para comparar las medianas de las diferentes líneas y la silvestre, así como la prueba de Mann-Whitney para comparar por pares las medianas de cada una de las líneas contra la silvestre. Para realizar estos análisis se utilizó el programa SPSS 10 para Windows.

XI. Silenciamiento del gen *AtLEA4-5*

Se realizó una construcción en el vector pHannibal (35S-NOS) insertando el ORF del gen *AtLEA4-5* en forma de invertidos repetidos separados por un intrón. La finalidad de esta construcción es que, al transcribirse el gen en ambas orientaciones, se forme un transcrito que sea autocomplementario y forme una estructura de tallo (gen) y asa (espaciador). Se ha visto que en plantas este tipo de estructuras de RNA de doble cadena son las que inducen en mayores porcentajes el silenciamiento del gen endógeno (con identidad de secuencia al transgen) (Smith *et al.*, 2000). Un fragmento de 4Kb que contiene la construcción descrita, se subclonó al vector binario pART27 (Gleave, 1992), el cual posee el gen de resistencia a kanamicina para su selección en plantas. Se transformaron por una crucea triparental bacterias de *Agrobacterium tumefaciens* (cepa C58/pGV2260) con las bacterias de *E. coli* transformadas con el vector que lleva la construcción, y en las colonias transconjugantes se verificó la presencia del gen en ambas orientaciones mediante un PCR en colonia. Se transformaron con el vector binario 20 plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia por el método de infiltración floral (Clough & Bent, 1998) y se cosecharon las semillas de la T₀. Se seleccionaron las plantas transgénicas plaqueando 2000 semillas aproximadamente en cajas Petri con kanamicina (50 µg/ml). Las plántulas de color verde se trasplantaron a una nueva caja con kanamicina para confirmar el fenotipo de resistencia al marcador. Se autofecundaron y se cosechó semilla de cada una por separado, estas semillas (T₁) se seleccionaron nuevamente en kanamicina y se estimó el número de inserciones del transgen por la segregación del marcador. Utilizando plantas de la generación T₂ se cuantificaron algunos de los parámetros mencionados en la sección anterior, es decir, porcentaje de sobrevivencia y número de yemas florales por planta después de rehidratar plantas que estuvieron sometidas a tratamiento de sequía, peso seco de las plantas sobrevivientes. Se

comprobó por experimentos tipo Western que las 5 líneas seleccionadas mostraran una disminución o ausencia en la acumulación de la proteína en condiciones de sequía debido al silenciamiento con respecto al control, que consistió en plantas silvestres que recibieron el mismo tratamiento.

RESULTADOS

I. Análisis bioinformático de la familia de proteínas LEA4: clasificación, motivos conservados y predicción de estructura secundaria.

Con la finalidad de reunir información sobre las características estructurales de las proteínas LEA de la familia 4, por un lado, se llevó a cabo un análisis de secuencia de los genes en el genoma de *Arabidopsis* para definir el número de miembros de la familia en esta especie vegetal. Por otro lado se rastrearon los bancos de datos disponibles correspondientes a diferentes especies vegetales, con el objetivo de establecer su representatividad en el reino vegetal, así como definir motivos o firmas conservadas que serán de utilidad para estudios funcionales. Se rastrearon los bancos de ESTs para las especies vegetales disponibles y se encontraron miembros de la familia LEA4 en monocotiledóneas y dicotiledóneas, así como en algunas especies de gimnospermas.

Se realizó un alineamiento múltiple de la región de α -hélice de cada secuencia con el programa T-Coffee (Notredame *et al.*, 2000) y las secuencias se introdujeron al programa BOXShade para resaltar las similitudes entre ellas (Fig.5a). Los motivos conservados que se distinguieron se describen en orden de importancia, debido a que un mayor número de secuencias que comparten dicho motivo, y entre paréntesis se indican los aminoácidos que se pueden encontrar en esa posición con una frecuencia semejante:

- 1) (V/L)(Q/E)KEMAT(E/Q)KKEE(K/R)VNQAE(L/M)DKQ(E/A)A(R/K)EHNAA
- 2) GMEKTKAT(V/L/A)QEKA(E/K/R)MT(T/A)RDP
- 3) KE(T/K)A(S/A)N(I/V)(G/A)ASAK

Se llevaron a cabo reconstrucciones filogenéticas con los métodos de Máxima parsimonia y Mínima Distancia Filogenética, pero estos análisis dieron como resultado árboles con muchas secuencias sin agrupar, haciendo difícil su interpretación (datos no mostrados). El árbol representado en la Figura 5b se realizó con el método de Máxima probabilidad, el cual indicó que las proteínas se agrupan principalmente en dos clados, uno corresponde a monocotiledóneas (arroz, cebada, sorgo) y el otro a dicotiledóneas, con algunas excepciones, como el caso de la proteína LEA4 de trigo, que se encuentra agrupada junto con las dicotiledóneas.

a

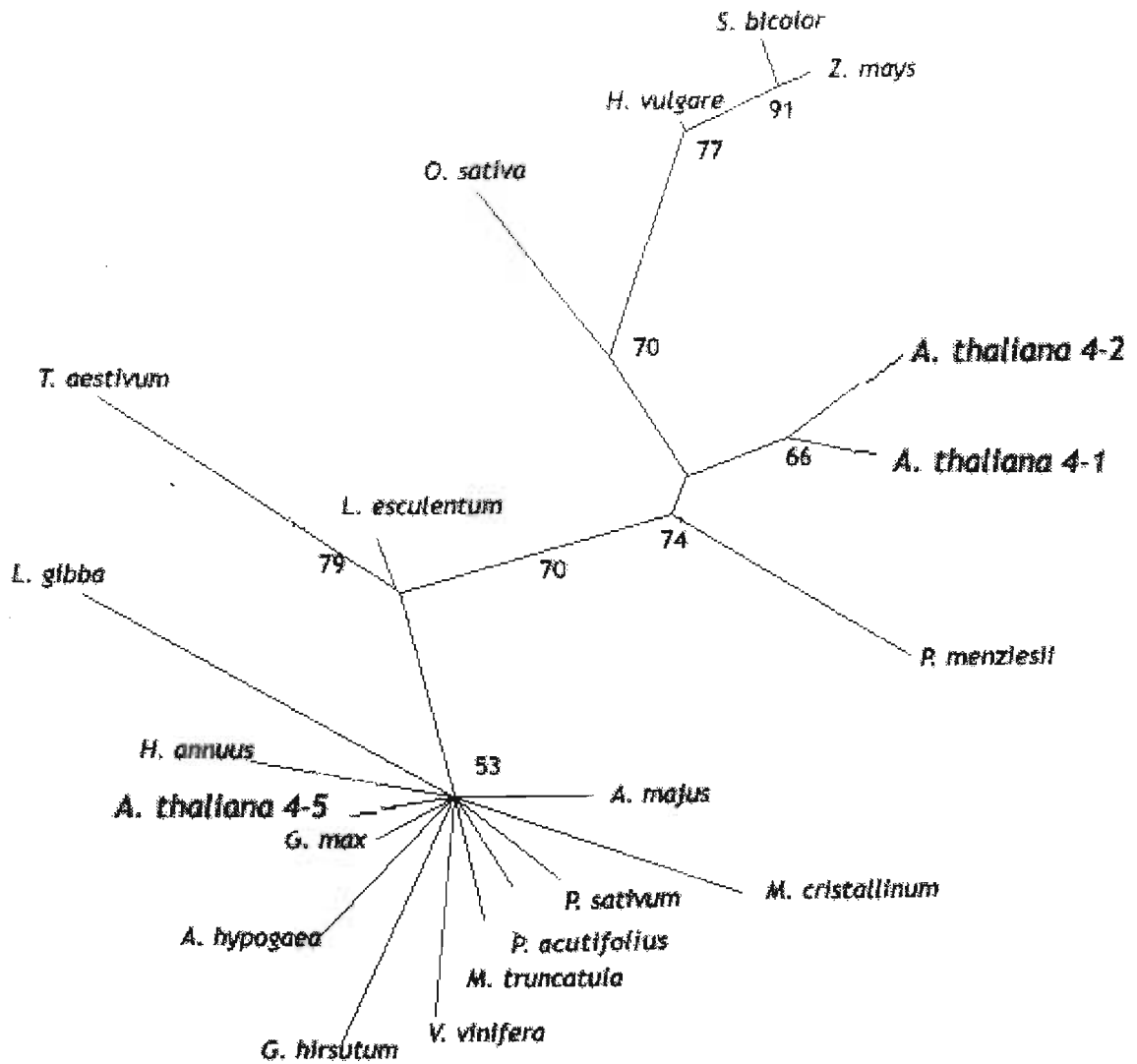
Antirrhinum majus 1 M...K...PAKPAASNTGAAKRSMEKTKATMOEKGEKMTTRDPVQKEMATEKKDERVH
M. cristallinum 1 MEW.....MKEKASNYMASKASAEKTKATVDEKKEKMMG...DQVDDKLATORKDEKKT
Pisum sativum 1 ME..K....TKETAANVGAASAKSGMEKTKANVOEKTERLITRDPLEKELATOKKEERVA
P. acutifolius 1 MGGKKAAVSVKETAASNTGASAKAGMEKTATVVEKAERLTARDPLQKEMATOKKEVKVN
Sorghum bicolor 1 MQ.....TAKVVKAKDMSBAKEKAKEATKMGKGTGEAFAATHGEKEMAKBAARAKKD
Zea mays 1 MQ.....TAKVVKAKDEVSSAKKKEKGSKAKMGKGTGEAFAATHGEKEMAKBAARAKKD
Hordeum vulgare 1 MQ.....TAKVVKKAVSSAREKAKEGTAKAGGTGAAATTHGEKEMAKBETRANKA
Triticum aestivum 1 MA.....TIAKVOEAAASAKAGITKAKATAGEKVKKATITDEKKEKBAEKKEDRMH
M. truncatula 1 MQGAKKAGETIKETAANIGASAKSGMEKTKATLOEFTKMTARDPVOKEMATHKKBKAKVN
Vitis vinifera 1 MQAGKGAEEAMKEKASNYAASABAGMEKTKATAQEKKERTAHDPMEKELATEKKDVLKT
L. esculentum 1 MQ.....TGA.....EASAAKAGMEKTKANVOEKAERMTTRDPVQKEMATEKKEDRVA
Gossypium hirsutum 1 MQ.....SMK.....EASAAKAGMEKAKASMOEKVLOKTRDPNEKEMAREKKEBQOE
Arachis hypogaea 1 MQATKKAVERNAKETAANIGASAKSGLEKTKATVTEKAEKI...STHDPVQKEMATHKKBKAKVN
Glycyne max 1 MGGKKAGESIKETAANIGASAKAGMEKTKATVQEKAEEMTARDPVOKELATOKKBAKVN
A. thaliana 4-5 1 MQ.....SMKETAASNTAASAKSGM...DKTKATLEKAEKI...KTRDPVQKEMATVKBKVN
Helianthus annuus 1 MCGKNAAA...AKETAANVAASAKAGMEKTKASLOEKGEKMTAHDPMKEMAREKKEBKH
Oryza sativa 1 MQ.....A...VKBKVKVKVSAVAKGKVKAKADEKKEVATARSHAEERLAEHAKARVA
A. thaliana 4-2 1 MQ.....SABKISDHASTAKEKUNIGGAKAGHAEKTMARTKKEKLAQEFKESKEA
A. thaliana 4-1 1 MQ.....SABKISDHASTAKEKUNIGGAKAGHAEKTMARTKKEKLAQEFKESKEA
Lemna gibba 1 MA.....OERAEKRAHT...EBKGLAAERKQOMVE
P. menziesii 1 MQPVKNAAA...AKKMSNA...ITREKLDTKASAEKEMHKS...TAHSGKRELAHTEKBAKEA
Picea glauca 1 ME.....KV...SAHN...TOKELAREKKE...DKKT

Antirrhinum majus 54 EABRQKQETROHNAAAKQA.
M. cristallinum 53 DAEVREQBAVHNAAQOQ..
Pisum sativum 54 QAELEKQARHNAATAVN
P. acutifolius 60 QAELEKLAHGHNAAKKAA
Sorghum bicolor 54 QASADKHQEKAEHRVDAAT
Zea mays 54 QANAKLQEKAEHRADAATG
Hordeum vulgare 54 QAKAEHMQEKAEHRADAAAG
Triticum aestivum 54 KVNSDERDEKSDHAAEISG.
M. truncatula 61 QAELEKLAAREHNAAVQOTT
Vitis vinifera 61 QAEMDKQAAQEHNAAAKAA
L. esculentum 50 AAELGKIRDAKAOHAAEKQCA
Gossypium hirsutum 50 DAELEKQEARHNAATAGHV.
Arachis hypogaea 61 QADMEKHBAAREHNAAKKISA
Glycyne max 61 QAELDKQARQHNTAAKQSA
A. thaliana 4-5 54 QAEMHKRETRONNAAMKEAA
Helianthus annuus 61 EAEYERQAAKHEHNAAQOQ..
Oryza sativa 54 AAKHMLHQKALHREEAIQH
A. thaliana 4-2 54 QAKADLHQKAEHAAADAQVH
A. thaliana 4-1 54 EANKDMHVAKAAHAEEDILMA
Lemna gibba 30 QAELNKQAAKHEENAAQWEOA
P. menziesii 61 EAEMRKHSAKAENKIQEEE
Picea glauca 25 EAENRANVTKBEHR...EHEOA

Abreviaciones

M. cristallinum *Mesembryanthemum cristallinum*
P. acutifolius *Phaseolus acutifolius*
M. truncatula *Medicago truncatula*
L. esculentum *Lycopersicon esculentum*
A. thaliana *Arabidopsis thaliana*
P. menziesii *Pseudotsuga menziesii*

b



0.1

Figura 5. Análisis de secuencia de la familia LEA4 de diferentes especies vegetales. (a) Alineamiento múltiple de secuencias de la familia LEA4 reportadas en los bancos de ESTs. El alineamiento se realizó con el programa T-Coffee. Los residuos idénticos se muestran en negro y los conservados en gris. Los números junto a la secuencia indican el aminoácido correspondiente. (b) Árbol filogenético realizado con el programa Puzzle, utilizando el método de "Maximum likelihood". Se observan dos grupos de secuencias, uno corresponde a monocotiledóneas y el otro a las dicotiledóneas. Cabe notar que existe una divergencia entre los miembros de la familia en *Arabidopsis*, ya que las proteínas AtLEA4-1 y AtLEA4-2 se agrupan con monocotiledóneas. El árbol se graficó con el programa TreeView para mostrar las distancias de las ramas y los números en las ramas corresponden a los porcentajes de confiabilidad.

Notablemente, las proteínas AtLEA4-1 y AtLEA4-2 están más relacionadas entre sí que con respecto a la AtLEA4-5 (Fig. 5b). Las dos primeras se agrupan en un clado con las proteínas LEA4 de cereales y la AtLEA4-5 se agrupa en otro clado junto con otras dicotiledóneas.

El algoritmo de predicción de estructuras secundarias de Garnier-Robson confirmó, de acuerdo con la predicción propuesta por Dure (1993), que las proteínas de la familia AtLEA4 tienen una región de aproximadamente 75 residuos que puede formar una estructura de α -hélice anfipática en el extremo amino y que tienen una región de tamaño variable (23-82 residuos) de estructura aleatoria en el extremo carboxilo (Fig. 6). También se muestran las gráficas de hidrofiliicidad (Kyle-Doolittle), así como las regiones que pueden formar α -hélices anfipáticas y las regiones flexibles a lo largo de la proteína (Fig. 6). Estas predicciones se realizaron utilizando el programa Protean (DNASTar, Inc.).

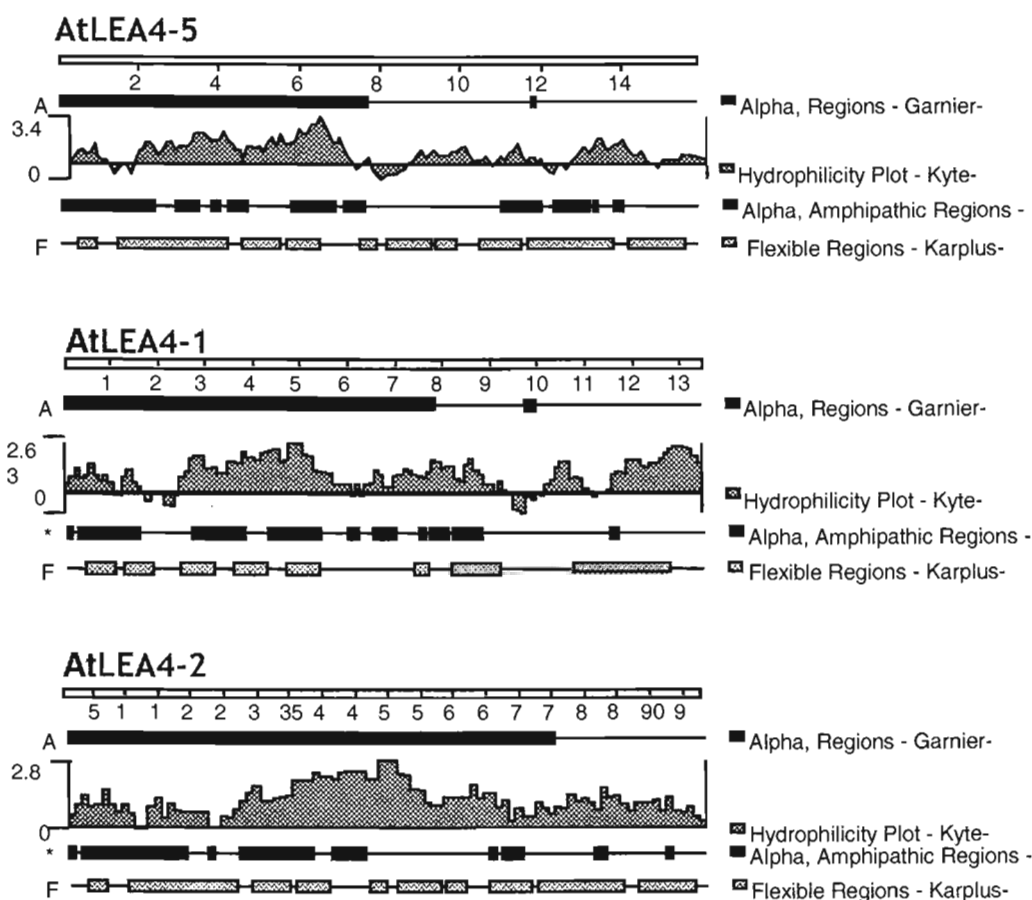


Figura 6. Predicción de estructuras secundarias de la familia AtLEA4. Se muestra una escala de la longitud de la proteína junto con la predicción de la formación de una estructura de α hélice, así como gráficas de hidrofiliicidad y regiones anfipáticas y flexibles para cada uno de los miembros de la familia. Se utilizó el programa Protean (DNASTar, Inc.) para predecir estas estructuras.

II. Caracterización de los patrones de acumulación de los transcritos de la familia *AtLEA4* durante la embriogénesis y en respuesta a déficit hídrico

La presencia y abundancia de un transcrito en un órgano o tejido determinado es información que en el futuro nos permitirá establecer una correlación con su función. Por otro lado, nos ofrece un parámetro comparativo en relación a las otras familias de genes *LEA*. Para ello se determinaron los patrones de acumulación de transcritos de cada uno de los miembros de la familia *AtLEA4*. En experimentos tipo Southern se comprobó la especificidad de reconocimiento de las sondas dirigidas contra cada uno de los miembros de la familia. Las señales detectadas después de hibridar en condiciones de alta severidad confirmaron que la sonda de cada gen reconoce de manera específica el cDNA correspondiente, ya que no se encontró hibridación cruzada entre los diferentes plásmidos que contienen los cDNAs para cada uno de los genes. (Fig. 7).

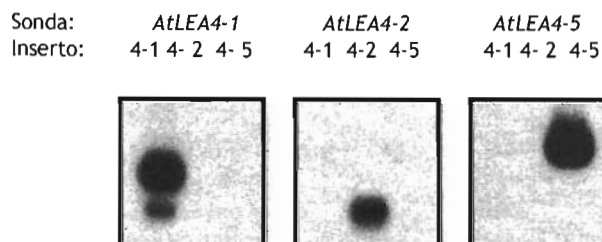


Figura 7. Experimento tipo Southern para demostrar la especificidad de reconocimiento de las sondas con el cDNA del gen correspondiente. Se realizó una digestión del vector TOPO con *EcoRI* en el caso de los genes *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2* y con *Nco I/Sal I* en el caso del gen *AtLEA4-5*, cuyo cDNA está clonado en el vector pBluescript KS+, para obtener aproximadamente 10 ng de cada inserto. Los productos de la digestión se cargaron por triplicado y se separaron en un gel de agarosa al 1.5%, se transfirieron a tres membranas de nylon. Las membranas se hibridaron en condiciones de alta severidad (1x SSC, 65 °C) con cada una de las sondas por separado.

Los transcritos de los tres genes se acumulan desde etapas tempranas en la embriogénesis de la semilla a partir de 1 a 5 días post-antesis (DPA) en niveles detectables por RT-PCR (Fig. 8), mientras que su acumulación es abundante en semillas maduras, donde se detecta una señal intensa en experimentos tipo Northern, a diferencia de las demás etapas del desarrollo (datos no mostrados). En las flores se encontró la acumulación del transcrito para el gen *AtLEA4-5* (Fig. 8).

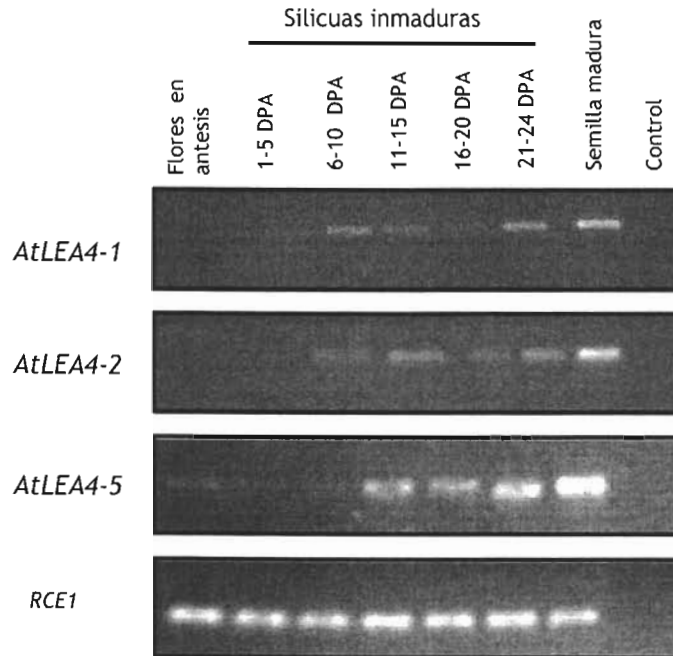


Figura 8. Patrones de acumulación de transcritos de la familia *AtLEA4* durante la embriogénesis en plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*. Experimentos tipo RT-PCR a partir de 2 μ g de RNA total de flores en antesis, silicuas en cinco periodos del desarrollo y semillas maduras. Se aplicó un total de 35 ciclos a las reacciones de PCR y se cargaron en cada carril una sexta parte de ellas. El control negativo corresponde al coctel de reacción sin cDNA. Los transcritos de la enzima conjugadora de ubiquitina RUB1 (*RCE1*) se muestran como controles de carga. DPA: días post-antesis.

Los transcritos de la familia *AtLEA4* se acumulan también en plantas de dos semanas de edad en respuesta a tratamientos con ABA 100 μ M, Polietilenglicol 25% (PEG), NaCl 100-200 mM y temperatura baja (4° C), aplicados durante 8 horas, especialmente en respuesta al tratamiento PEG (Fig. 9). La acumulación en respuesta a NaCl depende de la concentración, ya que el aumento en los niveles de acumulación de transcrito correlaciona con el aumento en la concentración de NaCl. Los transcritos correspondientes a los genes *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2* se acumulan en respuesta a frío pero en el caso de la *AtLEA4-5* los niveles de detección del experimento tipo Northern no indican la acumulación de transcrito en esta condición (Fig. 9).

Para establecer el efecto de la severidad en la limitación de agua sobre la acumulación de transcritos de esta familia, se diseñó un experimento de sequía con plantas adultas, de 6 a 7 semanas de edad. En este experimento se interrumpió el riego a las plantas y se tomaron muestras de flores, hojas y raíces a los 0, 2, 4, 7 y 10

días a partir de que se dejaron de regar. En cada uno de estos días se calculó el porcentaje de pérdida de agua en el sustrato, correspondiente a 0, 28, 44, 65 y 80%, respectivamente.

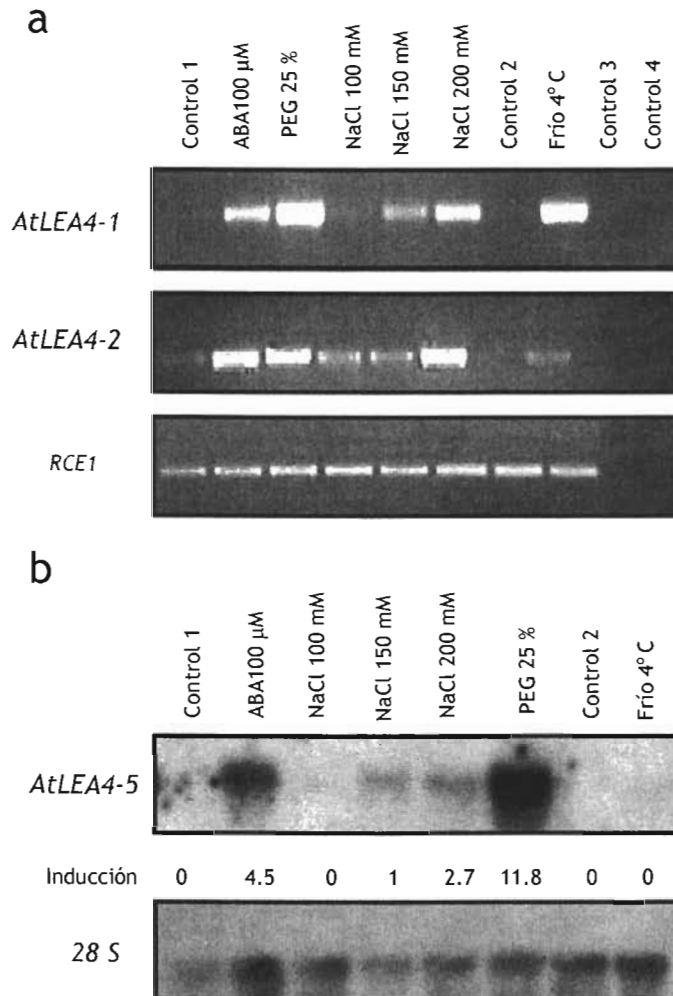


Figura 9. Patrones de acumulación de los transcritos de la familia *AtLEA4* en respuesta a tratamientos de estrés aplicados durante 8 horas utilizando plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana* de dos semanas de edad. (a) Análisis tipo RT-PCR (500 ng RNA total, 35 ciclos de la reacción de PCR) y (b) análisis tipo Northern (20 μ g RNA total). Los transcritos de la subunidad ribosomal 28S y de la enzima conjugadora de ubiquitina RUB1 (*RCE1*) se muestran como controles de carga. Se cuantificaron las bandas y se normalizaron de acuerdo a la carga los niveles de inducción de los transcritos correspondientes a la *AtLEA4-5*. La normalización se llevó a cabo mediante la cuantificación de bandas de los transcritos del gen 28S. Los tratamientos corresponden a: plantas colocadas en MS líquido sin adición de estrés (Control 1), ABA 100 μ M, PEG 25%, 100-200 mM NaCl, plantas crecidas en caja Petri con medio GM sólido sin transferir al medio líquido (Control 2), plantas en medio sólido transferidas a un cuarto frío (4°C), control del PCR sin la adición de RNA (Control 3) y control del RT-PCR utilizando *Taq* polimerasa en lugar de retrotranscriptasa (Control 4) para verificar la ausencia de contaminación por DNA genómico .

Se detectó en experimentos tipo Northern que el transcrito correspondiente al gen *AtLEA4-5* se acumula en todos los órganos de la planta bajo déficit hídrico, especialmente en raíces, en donde los niveles de acumulación de transcritos son hasta 9 veces más abundantes con respecto a los presentes en flores y hojas en respuesta a la misma severidad del estrés (Fig. 10a). Al cabo de 4 días sin riego, el sustrato empezó a mostrar signos de sequía moderada, al perderse más del 40% del agua. Conforme aumentó la severidad del estrés, esto es, cuando el sustrato había perdido entre el 65% y 80% del contenido de agua, se observó una menor acumulación en flores y raíces, pero aumentó transitoriamente en hojas (Fig. 10a).

En el caso de los transcritos de los genes *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2*, su detección sólo fue posible a través de análisis tipo RT-PCR, ya que en hibridaciones tipo Northern, utilizando las mismas condiciones de severidad que para los transcritos del gen *AtLEA4-5*, no se detectó ninguna señal aún después de exponer las películas fotográficas por 4-7 días. Los transcritos del gen *AtLEA4-1* se encuentran en flores y hojas de plantas control. En las flores hay una disminución en la acumulación del transcrito al inicio del experimento de sequía y posteriormente se induce su acumulación en estrés moderado (equivalente a un 44% de pérdida de agua en el sustrato) y permanece en todos los tejidos hasta el final del experimento, cuando el sustrato había perdido el 80% de agua después de 11 días sin riego (Fig. 10b). En las hojas se observa una acumulación transitoria en estrés moderado (28-44 % de pérdida de agua en el sustrato, PAS) y disminuyen hasta niveles basales en estrés severo (65-80% PAS). En las raíces los transcritos se detectaron a partir de un 28% PAS y su acumulación permaneció hasta el final del experimento. (Fig. 10b). Los transcritos del gen *AtLEA4-2* no se detectaron en flores, mientras que en hojas se detectan a partir de un 44% de PAS y permanece su acumulación en niveles de deshidratación severos (Fig. 10b). En las raíces se observa una acumulación basal en raíces de plantas control y plantas con un 28% PAS, induciéndose posteriormente su acumulación en déficit hídrico severo (Fig. 10b).

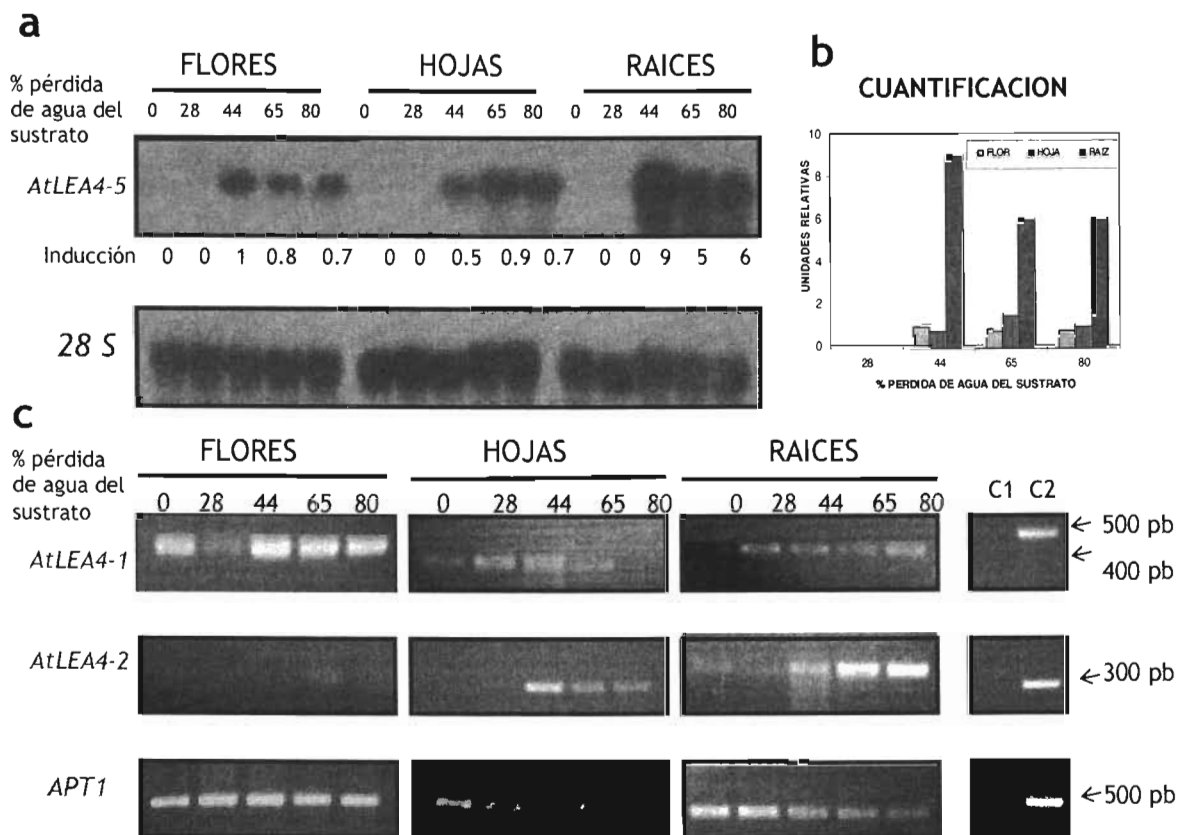


Figura 10. Patrones de acumulación de transcritos de la familia *AtLEA4* en respuesta a sequía en diferentes órganos de plantas adultas (6-7 semanas de crecimiento) de *Arabidopsis thaliana*. (a) Análisis tipo Northern (20 µg de RNA total). (b) Cuantificación de bandas correspondientes a los transcritos del gen *AtLEA4-5*. Los valores se normalizaron según la cuantificación de las bandas correspondientes a los transcritos del 28S. (c) Análisis tipo RT-PCR (2 µg RNA total, 35 ciclos en la reacción de PCR). El déficit hídrico se cuantificó como el porcentaje de pérdida de agua en el sustrato después de suspender el riego durante 0, 2, 4, 7 y 10 días, correspondiente a un 0, 28, 44, 65 y 80%, respectivamente. C1: control negativo del RT-PCR sin cDNA. C2: control positivo sin tratamiento con DNasa en donde se observan los productos de amplificación a partir de DNA genómico.

III. Caracterización de los patrones de acumulación de la proteína *AtLEA4-5* durante la embriogénesis y en respuesta a déficit hídrico

Aún cuando los niveles de acumulación de transcritos de un gen en respuesta a una condición determinada reflejan la sensibilidad y la presencia de ciertos mecanismos de control que regulan su abundancia, éstos no necesariamente reflejan los niveles de acumulación de la proteína para la cual codifican. Es por ello que resulta importante conocer qué tanto se afecta la acumulación de los productos finales de estos genes en respuesta a una condición ambiental determinada. En este trabajo se caracterizaron los patrones de acumulación de proteínas de uno de los miembros de la familia

AtLEA4, correspondientes a la proteína AtLEA4-5, ya que por el momento se cuenta con los anticuerpos que permiten su detección. Sin embargo, nuestro interés es conocer la abundancia de los tres miembros de la familia, para que de esta manera se pueda obtener un análisis más detallado del patrón de acumulación de esta familia de proteínas en respuesta a estrés y que nos permitirá hacer inferencias sobre su posible función.

Como primer punto, se estandarizaron las condiciones de inducción de la proteína, para lo cual se llevaron a cabo experimentos tipo Western utilizando plantas de dos semanas de edad que recibieron tratamientos de frío, así como diferentes concentraciones de NaCl y PEG. Los anticuerpos se inmunopurificaron del suero debido a que en estos experimentos preliminares se detectó la presencia de una banda con un peso molecular aparente de 20 KDa que corresponde a la proteína AtLEA4-5 y otras bandas de mayor peso molecular (Fig. 11a). El título de anticuerpos inmunopurificados disminuyó un orden de magnitud, ya que en el suero sin inmunopurificar los anticuerpos detectaban 10 ng de proteína recombinante en una dilución 1:2000, mientras que los anticuerpos inmunopurificados reconocen esta misma cantidad de proteína en una dilución 1:250 (Fig. 11b). Después de inmunopurificar los anticuerpos se detectó la banda correspondiente a la proteína AtLEA4-5 en semillas y en tejidos vegetativos sujetos a estrés osmótico, y en el caso del extracto de semillas se detectaron bandas de menor intensidad por arriba del peso molecular esperado aún con el uso de anticuerpos inmunopurificados. Debido a que las bandas de mayor peso molecular podrían representar oligómeros de la proteína se realizó un ensayo de competencia en donde se preincubaron los anticuerpos con diferentes concentraciones de antígeno y posteriormente se incubaron con una membrana donde se encontraban fijadas las proteínas de un extracto total de semillas maduras y uno de plantas de dos semanas tratadas con PEG 25% durante 8 horas. Estas dos condiciones se utilizaron para el ensayo de competencia ya que representan dos etapas del desarrollo donde se induce la proteína de manera abundante y en el caso de semillas maduras se había detectado la aparición de bandas de mayor peso molecular aún con el uso de anticuerpos inmunopurificados. El ensayo de competencia antígeno-anticuerpo indicó que los anticuerpos inmunopurificados dirigidos contra la AtLEA4-5 reconocen específicamente el antígeno, ya que la disminución en la intensidad de las bandas correlaciona con el incremento de antígeno presente en la preincubación con los

anticuerpos. Esto se observa tanto en semillas maduras como en tejidos vegetativos sujetos a estrés osmótico. (Fig. 11c).

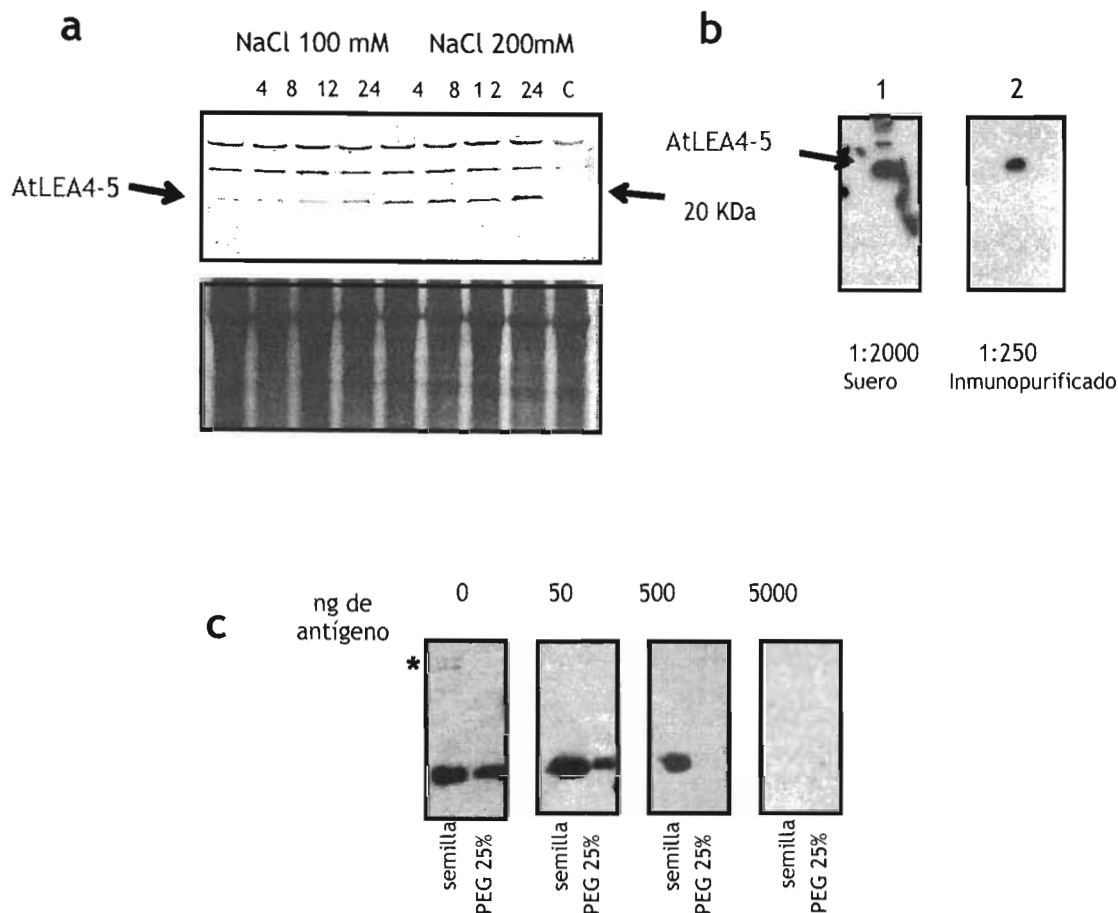


Figura 11. Experimentos tipo Western para estandarizar las condiciones de inducción de la proteína AtLEA4-5 durante la embriogénesis y en respuesta a déficit hídrico. (a) Cinética de acumulación de la proteína (20 µg de proteína total por carril) en respuesta a tratamiento con NaCl (100 y 200 mM) en donde se observa la presencia de bandas adicionales a la esperada aún en plantas control que no recibieron el tratamiento de NaCl. Como control de carga se muestra una réplica teñida con azul de Coomassie. (b) Inmunopurificación de anticuerpos policlonales dirigidos contra la AtLEA4-5. Carril 1: como control de la inmunopurificación se incubaron los anticuerpos directamente del suero con un extracto de proteína total de plantas de dos semanas tratadas con PEG 25% durante 8 horas (dilución 1:2000), en donde se observa la aparición de bandas adicionales como en el caso de (a). Carril 2: se detecta únicamente la banda correspondiente a la AtLEA4-5 al incubar los anticuerpos inmunopurificados (dilución 1:250) con este extracto protéico. (c) Ensayo de competencia para determinar la especificidad de reconocimiento de los anticuerpos inmunopurificados. En este tipo de ensayo se preincubaron los anticuerpos toda la noche con cantidades crecientes de antígeno (proteína recombinante obtenida de un extracto de bacterias enriquecido en la fracción soluble, las cuales fueron transformadas con el plásmido que lleva el ORF completo de la AtLEA4-5) y posteriormente se incubó esta mezcla antígeno-anticuerpo con las proteínas de un extracto total de semillas maduras y de plantas tratadas con PEG 25%. La desaparición de las bandas correspondientes a la AtLEA4-5 correlaciona con el aumento en la cantidad de antígeno presente en la preincubación. El asterisco indica la presencia de bandas de alto peso molecular en el control (sin antígeno) en el extracto de semilla, que también desaparecen al preincubar los anticuerpos con la proteína AtLEA4-5.

La proteína AtLEA4-5 está presente en todas las etapas de la embriogénesis en plantas silvestres bien irrigadas, tanto en flores como en silicuas en todas las etapas del desarrollo y semillas maduras (Fig. 12). Cabe mencionar que en las silicuas

formadas después de 15 días post-antesis (DPA) y hasta la etapa de post-absición de la semilla, los anticuerpos inmunopurificados reconocieron además de la banda correspondiente a la proteína del peso adecuado, otras bandas de mayor peso molecular que podrían representar homo-oligómeros y/o hetero-oligómeros de esta proteína. Resulta interesante que la aparición de estas bandas se detectó solamente en etapas de la embriogénesis tardía.

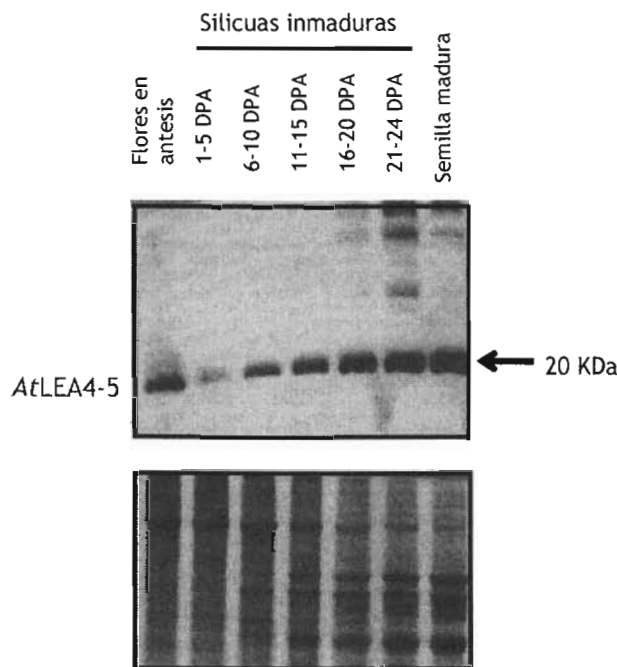


Figura 12. Experimento tipo Western del patrón de acumulación de la proteína AtLEA4-5 durante la embriogénesis en plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*. Se extrajo proteína total (10 µg) de flores en antesis, silicuas en cinco etapas del desarrollo y semillas maduras (post-absición). Como controles de carga se muestran réplicas de las muestras, teñidas con azul de Coomasie. DPA: días post-antesis

En plantas de dos semanas de edad expuestas a tratamientos de estrés abiótico, la proteína se acumula de manera abundante en respuesta a ABA 100 µM, PEG 25% y en niveles basales en respuesta a concentraciones elevadas de NaCl (Fig. 13a). Estos niveles corresponden con los niveles de acumulación de transcrito observados, ya que también hubo una mayor inducción de éstos en respuesta a ABA y PEG (Fig. 9). En plantas adultas sometidas a déficit hídrico la proteína se detectó en todos los órganos analizados a partir de 6 días sin riego, que corresponden a un 44% de pérdida de agua del sustrato (Fig. 13b). La acumulación fue más abundante en flores y raíces que en hojas, a pesar de que la acumulación de transcritos fue 10 veces mayor en las raíces que en las flores, comparando la misma severidad del estrés. En el caso de flores de plantas control y de plantas con un 28% de pérdida de

agua del sustrato se detectó la proteína en niveles basales y posteriormente se indujo su acumulación en los niveles subsecuentes de deshidratación. En las raíces se detectaron también bandas adicionales de menor peso que la proteína de interés en niveles de deshidratación del 44 y 65% de pérdida de agua del sustrato que probablemente representen productos de degradación de la proteína o la detección cruzada de los otros miembros de la familia, que son detectados por la sensibilidad del experimento, o ambos. Es necesario realizar otro tipo de experimentos con estos tejidos para determinar la identidad de estas bandas (Fig. 13b).

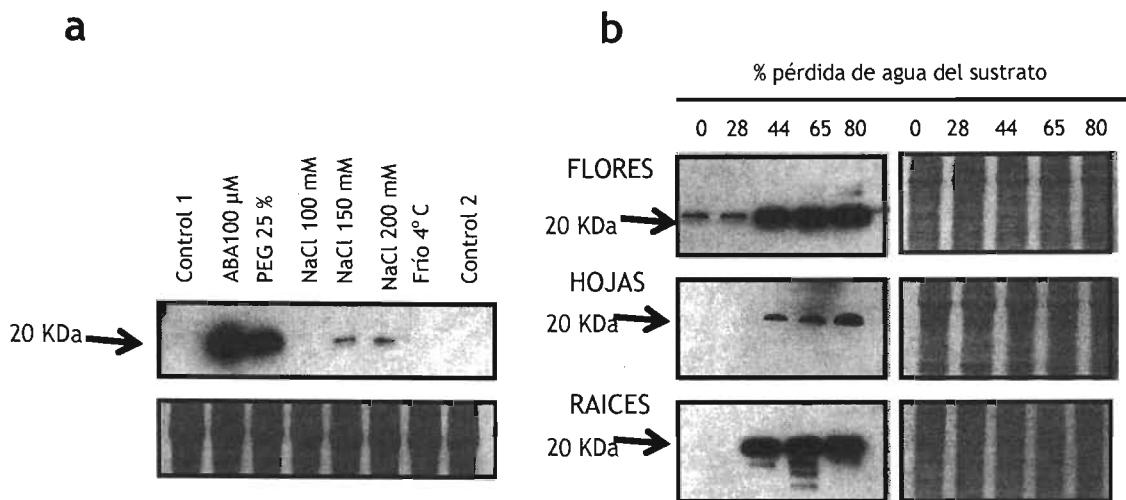


Figura 13. Experimentos tipo Western de los patrones de acumulación de la proteína AtLEA4-5 en respuesta a estrés en plantas silvestres de *Arabidopsis thaliana*. (a) Extractos de proteína total (20 μg) de plantas de dos semanas de edad sometidas a tratamientos de estrés durante 8 h. Los tratamientos corresponden a: plantas sin aplicación del estrés en medio de crecimiento líquido (control 1), ABA 100μM, PEG 25%, 100-200 mM NaCl, frío (4°C) y plantas en medio de crecimiento sólido (control 2). (b) Extractos de proteína total (10 μg) de plantas en edad adulta (6-7 semanas de crecimiento) sometidas a diferentes grados de déficit hídrico, medido como el porcentaje de pérdida de agua en el sustrato. Como controles de carga se muestran réplicas de las muestras. teñidas con azul de Coomasie.

IV. Sobre-expresión del gen *AtLEA4-5* en *Arabidopsis*

Dentro del análisis funcional de la familia AtLEA4 se utilizaron dos enfoques, el de ganancia y el de pérdida de función. Se utilizó como modelo a la proteína AtLEA4-5 debido a que se tenía el antecedente de los ensayos *in vitro* realizados en nuestro laboratorio, en donde la proteína AtLEA4-5 otorgó protección a la actividad de la enzima LDH durante deshidratación (para más detalles ver la sección IV.2 de la

Introducción). Adicionalmente, en los trabajos reportados de microarreglos en donde se analizan los niveles de acumulación de más de 7, 000 transcritos en respuesta a diferentes condiciones de estrés (deshidratación, alta salinidad y frío) se ha detectado que los transcritos correspondientes al gen *AtLEA4-5* están entre los que se inducen de manera más abundante en respuesta a estrés por deshidratación y alta salinidad. Por otra parte, los resultados obtenidos en esta tesis en cuanto a la caracterización de la familia *AtLEA4* en respuesta a déficit hídrico, indicaron que los niveles de acumulación de los transcritos correspondientes al gen *AtLEA4-5* son más abundantes con respecto a los otros dos miembros de la familia.

Para determinar si la sobre-expresión del gen que codifica para la proteína *AtLEA4-5* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* otorgaba un fenotipo de tolerancia en respuesta a déficit hídrico, se realizaron experimentos de germinación en condiciones de estrés y experimentos de sequía o riego con PEG 25% en plantas adultas. Para ello se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia con el plásmido binario 35S-NOS que lleva el ORF del gen *AtLEA4-5*. Se cosecharon las semillas y se sembraron 10 cajas con aproximadamente 2000 semillas cada una (20000 semillas) y se obtuvieron 12 plantas resistentes al marcador (eficiencia de transformación = 0.06%), de las cuales 8 llegaron a la edad adulta para cosechar las semillas de la T₁. Se germinaron estas semillas en medio sólido con kanamicina y se verificó que la segregación del transgen, medida por la proporción de plantas resistentes al marcador de selección, indicara que las líneas transgénicas tenían sólo una inserción (proporción 3 kan^R: 1 kan^S). Se obtuvieron 6 líneas independientes con una sola inserción, las plántulas se trasplantaron a macetas y se dejaron crecer para que se autofecundaran 15 plantas por línea y se obtuvieron plantas homocigotas para el transgen en la generación T₂ en cada línea, ya que al sembrar las semillas en kanamicina todas las plántulas tuvieron el fenotipo de resistencia al marcador. Se compararon los niveles de expresión del transgen (Fig. 14a) y la acumulación de la proteína (Fig. 14b) en las seis líneas en condiciones óptimas de crecimiento, encontrando una correspondencia en los niveles de acumulación de ambos, ya que las líneas con niveles de transcrito bajos (líneas 4 y 5), intermedios (línea 3) y altos (líneas 2, 6 y 7), mostraron similares niveles de acumulación de proteína.

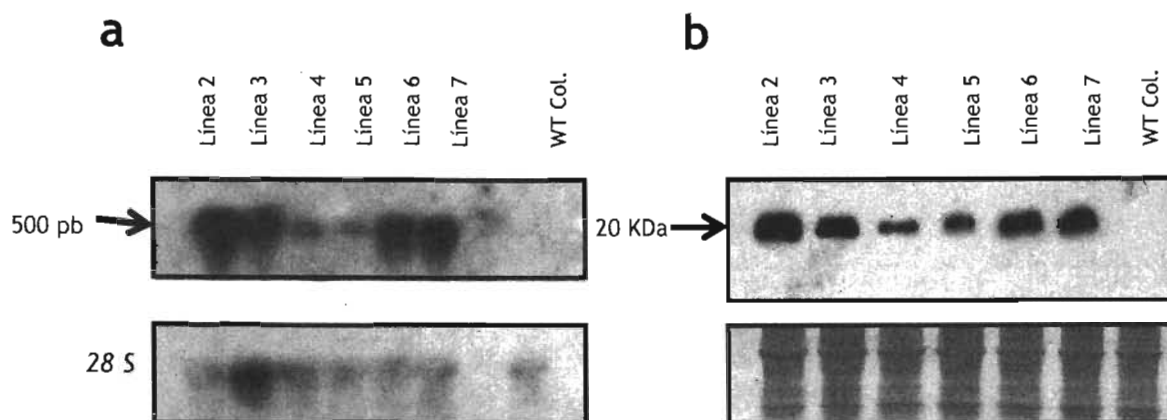


Figura 14. Niveles de acumulación de transcrito (a) y proteína (b) en líneas transgénicas homocigotas de *Arabidopsis thaliana* en experimentos tipo Northern y Western, respectivamente, para verificar la sobre-expresión del gen *AtLEA4-5*. Se extrajo RNA y proteína totales de plantas de dos semanas de edad y se cargaron 10 µg de extracto por carril. Como controles de carga se muestran los transcritos de la subunidad ribosomal 28 S (a) y réplicas de las muestras de proteínas teñidas con azul de Coomassie (b).

IV.1 Experimentos de germinación en presencia de estrés

Para explorar la posibilidad de que la sobre-expresión del gen *AtLEA4-5* otorgue un fenotipo de tolerancia durante el proceso de germinación en condiciones de estrés osmótico se llevaron a cabo experimentos de germinación en presencia de NaCl 250 mM y manitol 500 mM. No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes finales de germinación entre las líneas transgénicas y la silvestre, ya que se alcanzaron porcentajes de germinación cercanos o iguales al 100% aún en presencia de estas elevadas concentraciones de solutos en el medio de germinación. Sin embargo, la velocidad de germinación fue significativamente más baja en la mayoría de las líneas transgénicas (Fig. 15).

IV.2 Análisis fenotípico de plantas adultas de 6 a 7 semanas de edad en sequía

Para determinar si había diferencias otorgadas por la sobre-expresión del gen *AtLEA4-5* en el comportamiento de plantas adultas ante condiciones de déficit hídrico, se cuantificaron varios parámetros, tanto durante el proceso de deshidratación (contenido relativo de agua) como después de un periodo de recuperación (porcentaje de sobrevivencia, acumulación de biomasa, número de botones florales). En conjunto, estos parámetros nos indicaron que la sobre-expresión de la *AtLEA4-5*

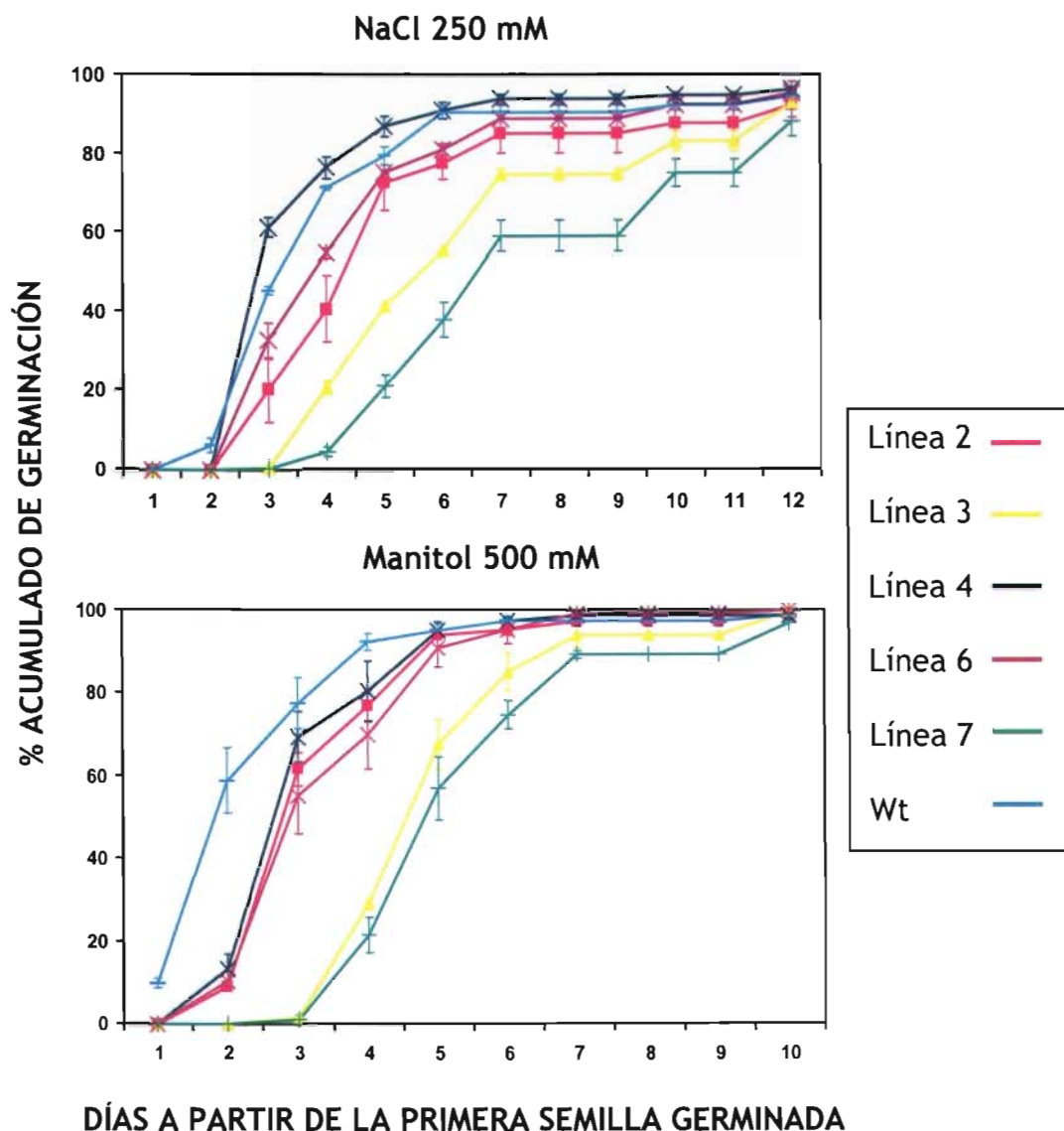


Figura 15. Porcentajes de germinación de semillas de *Arabidopsis* colocadas en cajas Petri con medio de germinación sólido con la adición de 250 mM de NaCl o 500 mM de manitol. Los días corresponden al tiempo en que se cuantificó la germinación, desde que germinó la primera semilla hasta que se obtuvo el 100% de germinación. La germinación se consideró como la emergencia de la radícula. Las barras indican el error estándar de 3 réplicas (cajas Petri) para cada línea y para la silvestre.

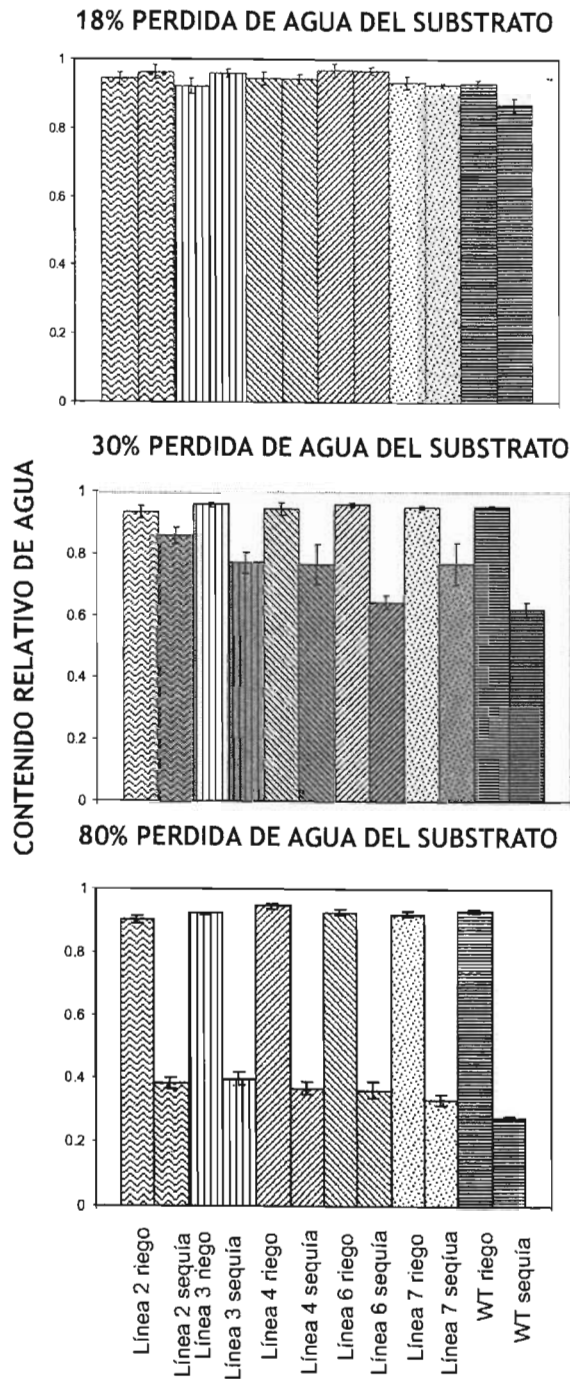
tuvo un efecto significativo en el desempeño de las plantas, durante y después del estrés. Una vez que iniciaron la etapa reproductiva las plantas adultas se dejaron de regar, cuantificando la pérdida gradual de agua en el sustrato. El porcentaje de pérdida de agua en el sustrato al cabo de dos semanas fue del 80%. El contenido relativo de agua fue significativamente mayor en las líneas transgénicas 2 y 3 en situaciones de estrés moderado y severo, que corresponden a porcentajes de pérdida

de agua en el sustrato del 30 y 80% ($p= 0.05$ y $p= 0.007$, respectivamente, Fig. 16a). Por otra parte, se cuantificaron los porcentajes de sobrevivencia de plantas que sufrieron un estrés severo, y que posteriormente fueron rehidratadas. Se rehidrataron con solución nutritiva y al cabo de 10 días de recuperación se cuantificó el número de plantas que sobrevivieron. Se consideraron sobrevivientes a las plantas que mostraron la aparición de nuevo tejido fotosintético. Las plantas transgénicas mostraron mayores porcentajes de sobrevivencia comparados con las silvestres (Tabla 2, Figura 17). Como parámetro para cuantificar la capacidad reproductiva que pueden tener las plantas después de haber sufrido una sequía prolongada y haberse recuperado de la misma, se cuantificó la producción de botones florales nuevos. Las plantas transgénicas los produjeron a diferencia de las plantas silvestres, por lo que se encontraron diferencias significativas entre todas las líneas transgénicas con respecto a las plantas silvestres ($p= 0.002$, Tabla 2, Figura 17). El crecimiento de las líneas transgénicas que sobre-expresan la AtLEA4-5 también fue mayor que el de las plantas silvestres. El crecimiento se midió como la acumulación de biomasa en peso seco después de 10 días de rehidratación (Figura 16b), y los análisis de varianza también indicaron que había diferencias significativas entre las líneas 3 y 4 con respecto a las plantas silvestres ($p= 0.017$). La mayoría de los tejidos aéreos de la planta que estuvieron expuestos a estrés severo se marchitaron, por lo que se desecharon antes de colocar las plantas en el horno para tomar las medidas del peso

Tabla 2. Cuantificación de los porcentajes de sobrevivencia y número de botones florales en plantas adultas que fueron rehidratadas durante 10 días después de haber sufrido un periodo de deshidratación. Para los porcentajes de sobrevivencia se muestran los valores correspondientes a tres réplicas con cuatro plantas cada una y el error estándar, así como el promedio del número de botones florales por planta ($n=12$) junto con el error estándar.

LINEA	% DE SOBREVIVENCIA	NUMERO DE YEMAS
WT	66.7 ± 12.5	0
2	87.5 ± 12.5	2.91 ± 1.24
3	100	4.08 ± 1.52
4	100	5.75 ± 2.23
6	100	5.08 ± 0.98
7	100	3.92 ± 1.35

a



b

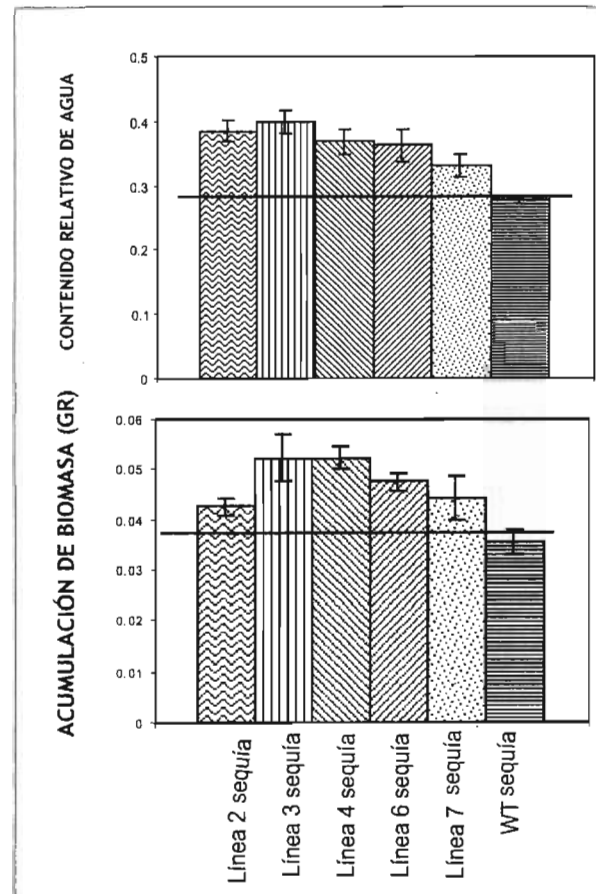
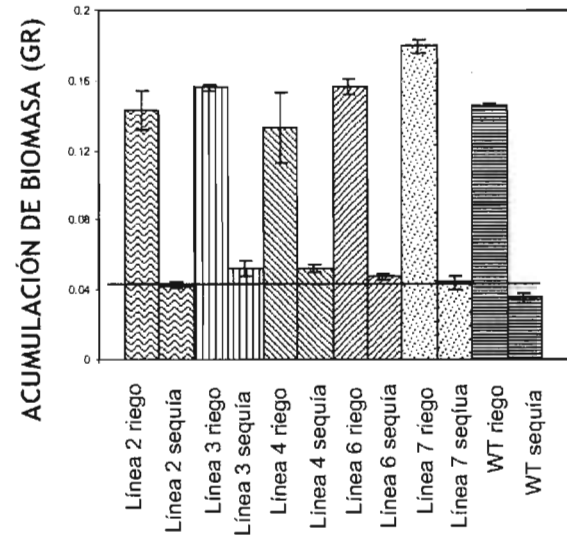
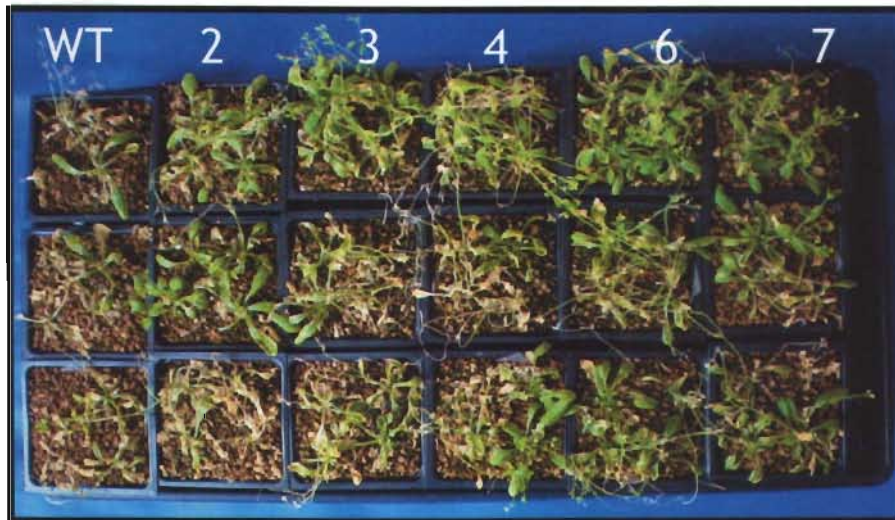


Figura 16. Análisis fenotípico de líneas homocigotas (T2) que sobre-expresan la proteína AtLEA4-5 en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*. a) Contenido relativo de agua (CRA) de plantas sujetas a diferentes severidades de déficit hídrico, medido como el porcentaje de pérdida de agua en el sustrato (PAS), b) Acumulación de biomasa después de un periodo de 10 días de rehidratación de plantas que estuvieron expuestas a un tratamiento de sequía por falta de riego durante 2 semanas, hasta alcanzar PAS de 80%. Las barras indican el error estándar de tres réplicas por tratamiento. Se muestran en un recuadro los tratamientos de sequía de las gráficas correspondientes al CRA de plantas con un 80% de PAS y acumulación de biomasa para verificar las diferencias significativas entre las líneas transgénicas y la silvestre.

a



b



Figura 17. Análisis fenotípico de líneas transgénicas que sobre-expresan la proteína AtLEA4-5 en plantas adultas de *Arabidopsis thaliana*. Se aplicó un tratamiento de sequía por falta de riego durante dos semanas hasta alcanzar porcentajes de pérdida de agua en el sustrato del 80%. Se rehidrataron las plantas y se dejaron recuperar durante 10 días, al cabo de los cuales se cuantificó el número de plantas sobrevivientes, es decir, que presentaran la aparición de nuevas hojas de la roseta y la presencia o ausencia y número de yemas florales por planta. a) Fenotipo de las plantas silvestres (WT) y las líneas transgénicas (2, 3, 4, 6, 7) después del periodo de recuperación, b) Acercamiento de las plantas silvestres y las líneas transgénicas 6 y 7.

seco. De manera general, la acumulación de biomasa observada en las plantas transgénicas correlaciona con una mayor capacidad de mantener hidratados los tejidos durante el estrés, ya que las líneas sobre-expresoras con niveles altos de acumulación de proteína (Fig. 14b), tuvieron un contenido relativo de agua mayor en situaciones de estrés moderado y severo, con excepción de la línea 4, que a pesar de mostrar bajos niveles de acumulación de proteína, fueron capaces de acumular una mayor cantidad de biomasa durante la recuperación del estrés (Fig. 16).

Silenciamiento del gen *AtLEA4-5*

Otro de los enfoques que se utilizaron dentro del análisis funcional de la familia *AtLEA4*, fue el análisis por pérdida de función. Se transformaron plantas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Columbia con el plásmido que contiene una construcción que desencadena el silenciamiento del gen *AtLEA4-5*. Se cosecharon las semillas (T_0) para seleccionar las que fueron transformadas. Se plaquearon 12 cajas con aproximadamente 2000 semillas cada una (24 000 semillas) y se obtuvieron 54 plantas resistentes al marcador (eficiencia de transformación= 0.23%), de las cuales 37 llegaron a la edad adulta para cosechar las semillas de la T_1 y se realizaron análisis fenotípicos preliminares con estas plantas. Los tratamientos aplicados a las plantas silenciadas fueron similares a los aplicados a plantas que sobre- expresan el mismo gen, es decir, irrigación óptima, sequía o riego con PEG 25%. Se realizó un experimento tipo Western de estas plantas en sequía y se observó que los niveles de acumulación de la proteína disminuyeron en diferentes grados con respecto a la acumulación que se induce en plantas silvestres en sequía, obteniendo unas líneas con expresión similar a la silvestre (línea 19), otras con niveles bajos de acumulación (líneas 6 y 9) y el silenciamiento completo del gen en una sola línea (Fig. 17). Debido a que en los experimentos preliminares para analizar el fenotipo no se encontraron diferencias significativas con respecto a la silvestre, se autofecundarán plantas de la T_1 , para contar con más líneas que tengan silenciamiento total del gen en la T_2 y comprobar el fenotipo durante sequía utilizando líneas homocigotas para el transgen.

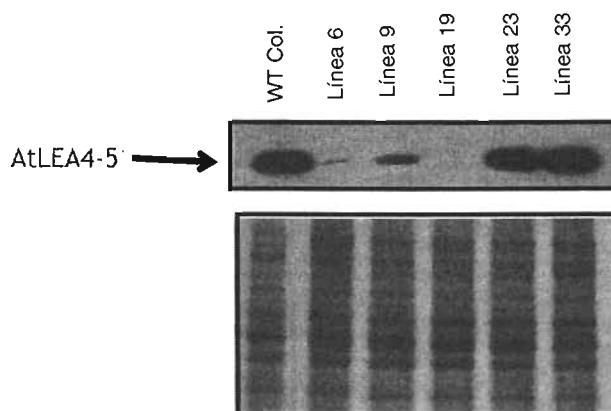


Figura 17. Silenciamiento del gen *AtLEA4-5* en plantas adultas de *Arabidopsis thaliana* por el método de interferencia de RNA. Experimento tipo Western (10 μ g de proteína total) de plantas sujetas a un déficit hídrico de 10 días sin riego (correspondiente al 80% de pérdida de agua en el sustrato), donde se demuestran los niveles de disminución de la proteína *AtLEA4-5* en las diferentes líneas transgénicas (T_1) con respecto a la silvestre. Se observa el silenciamiento total del gen en la línea 19, mientras que las líneas 6 y 9 muestran acumulación residual de la proteína y las líneas 23 y 33 acumulan cantidades similares a la silvestre.

DISCUSIÓN

CARACTERÍSTICAS ESTRUCTURALES DE HIDROFILINAS DE LA FAMILIA AtLEA4

Una de las adaptaciones comunes a organismos procariotes y eucariotes dentro de la respuesta al estrés osmótico, es la inducción de la expresión de proteínas altamente hidrofílicas, chaperonas y solutos compatibles, entre otros mecanismos. El conjunto de respuestas que desencadenan las vías de señalización debida a la percepción de un estrés en particular, dan lugar a la adaptación al medio. Para poder hipotetizar sobre el papel de esta familia de proteínas hidrofílicas es importante tener en cuenta algunos aspectos de sus características estructurales. Se ha sugerido que el significado biológico de la existencia de proteínas altamente hidrofílicas, como las hidrofílicas, responde a la necesidad de mantener hidratados los tejidos en potenciales osmóticos bajos, para proteger estructuras celulares y macromoléculas o interactuando con membranas (McCubin y Kay, 1985; Garay-Arroyo *et al.*, 2000; Koag *et al.*, 2003). El elevado porcentaje de glicinas y de aminoácidos cargados y no polares de las hidrofílicas, así como su abundante acumulación en la etapa de desecación de las semillas y en tejidos vegetativos sujetos a déficit hídrico, apoya el papel protector de estas proteínas en la respuesta adaptativa ante este tipo de estrés (Garay-Arroyo *et al.*, 2000).

Los estudios espectroscópicos de varias hidrofílicas de plantas y animales demuestran que en su estado nativo estas proteínas no poseen una estructura secundaria rígida (Lisse *et al.*, 1996; Soulages *et al.*, 2002; Goyal *et al.*, 2003). Su función podría ser semejante a la de otras proteínas intrínsecamente desordenadas (PID), que modifican su estructura y/o dominios dentro de la proteína cuando se unen a sus moléculas blanco para llevar a cabo diversas funciones dentro de procesos celulares, como reconocimiento y unión a RNA, regulación del ciclo celular e iniciación de la traducción (Wright y Dyson, 1999). Se ha propuesto que las PID se dividen en 5 categorías funcionales, entre ellas, inhibidores, atrapadores y ensambladores; donde las proteínas que se expresan durante déficit hídrico en plantas pertenecen a la categoría de atrapadores para almacenar o neutralizar ligandos pequeños, como las moléculas de agua (Tompa, 2002). Se ha demostrado la transición de estados de estructura aleatoria a conformaciones secundarias tipo α -

hélice anfipática, inducidos por cambios en la temperatura en una proteína LEA de la familia 1 de soya (Soulages *et al.*, 2002), así como por la unión a vesículas lipídicas en una dehidrina de maíz (Koag *et al.*, 2003) o por déficit hídrico en una proteína similar a LEA3 de nemátodo (Goyal *et al.*, 2003). Esta transición en la estructura secundaria de las proteínas podría otorgar una mayor especificidad al proceso de interacción de la proteína con el agua en situaciones de déficit hídrico, al mismo tiempo que se regularía su actividad protectora en respuesta a las modificaciones en las condiciones del medio. Para la familia LEA4 no se han reportado este tipo de trabajos, por lo que sería conveniente abordar estudios en los que se detecte si los miembros de la familia son también PID que puedan adoptar estructuras secundarias como consecuencia de un estrés o al unirse a su blanco, como se ha hipotetizado para otras proteínas LEA estudiadas. Entre los principales métodos para estos fines se encuentran: resonancia magnética nuclear, espectroscopía (dicroísmo circular, medidas de la actividad óptica Raman), así como técnicas hidrodinámicas y calorimétricas (Tompa, 2002). Alguna de estas técnicas podría utilizarse para determinar la posible transición de un estado de estructura aleatoria a lo largo de toda la proteína a otro estado, inducido por déficit hídrico, de α -hélice anfipática seguido de una región aleatoria de tamaño variable, como se ha predicho para esta familia de proteínas en *Arabidopsis*. Sería interesante comparar los patrones observados para cada uno de los miembros de la familia en función de la longitud de la región de estructura aleatoria y su capacidad de retención de un mayor número de moléculas de agua, mediante su interacción con los aminoácidos hidrofílicos que se encuentran en esta región.

La existencia de motivos conservados y la estructura secundaria similar en los miembros de la familia LEA4 de diferentes especies vegetales, tanto monocotiledóneas, dicotiledóneas y gimnospermas, supone una antigua aparición de esta familia de proteínas en la evolución de las plantas. La búsqueda en bases de datos de organismos en los cuales la función de proteínas que contengan motivos similares a los encontrados en las proteínas LEA4 se conozcan, podría ayudar en el conocimiento de los posibles blancos de estas proteínas. El hecho de que las proteínas AtLEA4-1 y AtLEA4-2 se agrupen en clados hermanos junto con monocotiledóneas, mientras que la AtLEA4-5 se agrupe junto con otras dicotiledóneas, así como la mayor similitud entre las proteínas AtLEA4-1 y AtLEA4-2 con respecto a la AtLEA4-5, sugiere que la aparición de los genes que codifican para estas dos proteínas tuvo lugar por eventos de duplicación genética a partir del gen

AtLEA4-5 y posteriormente divergieron en la región de α -hélice. Se sabe que la duplicación genética es un mecanismo clave dentro de la evolución de los genomas. En *Arabidopsis* se ha postulado que gran parte de su genoma es el resultado de eventos de reorganización y duplicación genética, en donde el primer evento de duplicación ocurrió hace aproximadamente 38 millones de años, y probablemente este evento pudo haber contribuido a la divergencia entre *Arabidopsis* y su género hermano *Brassica* (Ermolaeva *et al.*, 2003). Después del evento de duplicación, los genes experimentan un relajamiento en las restricciones evolutivas, lo cual promueve la diversificación funcional de los genes duplicados y permite innovaciones bioquímicas a través de mutaciones y recombinación (Wagner, 2001). La homología de secuencia de la *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2* con proteínas LEA de monocotiledóneas, puede indicar la especialización funcional para ciertos blancos en común, por ejemplo algún tejido u órgano en particular. Por otra parte, en el caso de la duplicación de genes individuales, se ha encontrado que los pares de duplicados están sujetos a una selección purificadora, estimando que su vida media es de 3 a 7 millones de años, por lo que más del 90% de los duplicados desaparecen antes de 50 millones de años, y se sugiere que este proceso puede tener un papel importante en la especiación (Lynch & Conery, 2001). Existen tres alternativas en la evolución de genes duplicados, la no-funcionalización, la neo-funcionalización y la sub-funcionalización, que permiten explicar la redundancia funcional y la diferenciación en los patrones de expresión (Chen *et al.*, 2004). En un estudio de genética de poblaciones con un par de genes parálogos que se inducen por ABA y estrés ambiental, *AtHVA22d* y *AtHVA22e*, se encontró que tienen niveles contrastantes de diversidad genética, ya que el primero tiene una mayor tasa de variaciones no sinónimas, y se explicó mediante un relajamiento en las restricciones evolutivas en este gen, después del evento de duplicación, así como por procesos demográficos de deriva génica. Todos los miembros de la familia se expresan en yemas florales, con excepción del parálogo *AtHVA22e*, lo cual implica que su expresión se perdió en ese locus de acuerdo al modelo de subfuncionalización a través de procesos de duplicación-degeneración-complementación para esta familia (Chen *et al.*, 2004). En el caso de la familia *AtLEA4*, no se encontraron transcritos para el gen *AtLEA4-2* en flores, por lo que un mecanismo similar podría haber ocurrido en esta familia, dando lugar a una subfuncionalización y una complementación en los patrones de expresión en diferentes órganos de la planta.

La presencia de familias multigénicas puede aludir a la importancia en la función desarrollada por las proteínas codificadas en esa familia de genes, ya que al tener una elevada homología de secuencias y similitud estructural podrían tener redundancia funcional, como se ha observado en otras familias de proteínas como los factores transcripcionales MADS box (Pinyopich *et al.*, 2003) . En la familia AtLEA4 se distingue que la región más conservada en los tres miembros es la que se predice que forma una estructura de α -hélice anfipática, mientras que la región de estructura aleatoria está menos conservada y tienen diferente longitud en cada uno de los miembros. En la AtLEA4-5 la región de estructura aleatoria constituye la mitad de la proteína, en tanto que en la AtLEA4-1 es de un tercio de la longitud y en la AtLEA4-2 equivale al 25% de la proteína. Estas diferencias en la longitud de la región de estructura aleatoria cuestiona la importancia de esta región hidrofílica y sugiere que cada uno de los miembros podría cumplir un papel diferente en la capacidad de retención o almacenamiento de agua, por lo que los patrones de expresión de esta familia de proteínas se podría correlacionar con la intensidad del estrés o con la interacción con blancos específicos de un órgano o tejido de la planta.

PATRONES DE ACUMULACIÓN DE TRANSCRITOS DE LA FAMILIA *AtLEA4* Y LA PROTEÍNA *AtLEA4-5* DURANTE LA EMBRIOGÉNESIS Y EN RESPUESTA A ESTRÉS.

Los transcritos de la familia *AtLEA4* se acumulan en condiciones normales del desarrollo desde etapas tempranas de la embriogénesis (6-15 días post antesis, DPA). En la familia *AtLEA1* también se ha reportado la acumulación de transcritos en semillas inmaduras, codificados por los genes *AtEM1* y *AtEM6*. La expresión de estos genes se detecta desde 13-16 DPA y es específica de semillas, ya que no se inducen los transcritos en plantas adultas en respuesta a deshidratación, salinidad y frío. Además, los transcritos de esta familia muestran una localización diferente en los tejidos de la semilla, *AtEM1* se detecta en tejidos prevasculares, mientras que *AtEM6* es ubicuo (Bies *et al.*, 1998). En una biblioteca substractiva de cDNAs de semillas maduras de *Arabidopsis*, se detectaron 179 secuencias únicas correspondientes a los genes que se expresan abundantemente en esta última etapa del desarrollo de la semilla. Entre ellos se encontraron los cDNAs correspondientes a los tres miembros

que conforman a la familia *AtLEA4* (Delseny *et al.*, 2001). En esta tesis, se confirmaron estos resultados en análisis tipo Northern (datos no mostrados) y RT-PCR, ya que se encontró una acumulación abundante de los transcritos de la familia en semillas maduras. Resulta interesante que en el desarrollo de la semilla la proteína *AtLEA4-5* se acumule también en las flores y en las silicuas verdes, ya que en estos órganos no hay una deshidratación severa de los tejidos como en el caso de las semillas maduras. En las flores podría deberse a que la proteína se acumule en el polen, como se ha demostrado en otras proteínas LEA (Nylander *et al.*, 2001), pero en las silicuas verdes una posibilidad para explicar su presencia durante el desarrollo podría deberse a que se requiere en ciertas etapas de la embriogénesis, por cambios en el estatus hídrico de la célula, y su inducción sea muy sensible a éste. Por ejemplo, en la etapa de expansión celular del embrión, puede haber una disminución gradual en el potencial osmótico por la acumulación de solutos (p. ej. proteínas de reserva, carbohidratos) y haya una acumulación gradual de la proteína *AtLEA4-5*. Se ha observado un fenómeno similar en el caso de la *PvLEA-18* de frijol, que se expresa en regiones de hipocotilos que se encuentran en elongación activa en plantas bien irrigadas, que además son zonas de potencial osmótico bajo (Colmenero-Flores *et al.*, 1999). La mayoría de las proteínas LEA se acumulan abundantemente en la etapa de maduración de las semillas, cuando inicia la desecación de sus tejidos (Ingram y Bartels, 1996). Sería muy interesante conocer el papel de las proteínas de la familia *LEA4* en el desarrollo de las semillas, por ejemplo, ver si interactúan con un blanco dentro de la célula o si se acumulan gradualmente en su estructura nativa en el citosol hasta llegar a la etapa de desecación.

Por otra parte, en plantas de dos semanas de edad, los transcritos de la familia *AtLEA4* se acumulan en respuesta a la aplicación de ABA, mientras que en respuesta a tratamientos que inducen déficit hídrico hubo una acumulación diferencial, ya que la mayor inducción se observó en tratamientos con PEG, comparado con la acumulación en respuesta a NaCl y frío. Lo anterior sugiere que los elementos *in cis* que controlan la expresión de la familia *AtLEA4* incluyen elementos que no están presentes en los promotores de los genes como *AtEM1* y *AtEM6*, ya que, como se mencionó anteriormente, éstos se acumulan únicamente en la embriogénesis, por lo que sería interesante hacer una comparación de las regiones promotoras de estas dos familias para descubrir cuáles son los que confieren una respuesta durante la embriogénesis y cuáles en tejidos vegetativos sujetos a déficit

hídrico. Los niveles de acumulación de proteína AtLEA4-5 corresponden con la acumulación de transcritos, ya que se encontró una acumulación abundante en respuesta a ABA y PEG, mientras que hubo una acumulación basal en respuesta a tratamientos de estrés salino y no se detectó en respuesta a frío. Cabe recordar que los tratamientos fueron de 8 horas, pero en experimentos iniciales de cinéticas de inducción en un intervalo de 4 a 24 horas, la proteína se acumula en respuesta a NaCl en mayores niveles después de 8 horas y el nivel se mantiene hasta las 24 horas, mientras que en respuesta a frío no se detectó en ningún punto de la cinética (datos no mostrados).

En plantas adultas sometidas a diferentes severidades de déficit hídrico, se encontró que los transcritos para los tres genes se acumulan en hojas y raíces con diferentes cinéticas, mientras que en las flores sólo se detectan los correspondientes a *AtLEA4-1* y *AtLEA4-5*. Los análisis tipo Northern indicaron que en los transcritos correspondientes a *AtLEA4-5*, la mayor inducción se encontró en las raíces con respecto a flores y hojas, comparando la misma severidad del estrés. Durante el proceso de deshidratación, el órgano que percibe el estrés con mayor intensidad es la raíz, por lo que se puede explicar la abundancia de transcritos en este órgano en particular, como se ha visto para otros genes *LEA* (Colmenero-Flores et al., 1997). Se detectaron niveles basales de proteína AtLEA4-5 en flores de plantas control y plantas con un porcentaje de pérdida de agua del sustrato hasta de 28%, pero no se detectaron los transcritos correspondientes en experimentos tipo Northern, probablemente debido a la sensibilidad del ensayo, ya que en otros experimentos sí fue posible detectar el transcrito en flores de plantas control (como el caso de la embriogénesis) a través de RT-PCR. La inducción de la expresión de la proteína se presentó en todos los tejidos a partir de porcentajes de pérdida de 44% y se mantuvo constante en flores y raíces hasta el final del experimento, mientras que, en hojas, se detectó una mayor acumulación conforme aumentó la severidad del estrés. Esta falta de correspondencia en los patrones de acumulación de transcrito y proteína en plantas adultas sugiere que hay mecanismos que estabilizan los RNAm o que existe un control post-transcripcional en estos órganos, ya que a pesar de que la acumulación de transcritos en flores es cerca de 10 veces menos que en raíces, se detecta una acumulación muy abundante de proteína, casi en los mismos niveles de acumulación que en raíces. Sería necesario investigar si en las regiones no traducidas del transcrito se localizan secuencias que confieran una mayor expresión en un tejido

u órgano en particular, como se ha visto en el caso de *PvLEA-18* (Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001).

El uso de la tecnología de microarreglos en *Arabidopsis* para determinar los cambios en el patrón de expresión de genes de manera global en respuesta a sequía, temperaturas bajas y estrés salino, representa una herramienta muy útil para conocer la respuesta general de la planta ante estrés abiótico. Entre los genes cuya expresión se induce significativamente en respuesta a estos tipos de estrés se encuentran los genes que codifican para proteínas LEA (Seki *et al.*, 2002). En ese estudio se encontró que el cDNA correspondiente al gen *AtLEA4-5* se induce más de tres veces con respecto al control en respuesta a tratamientos de sequía. En otro análisis de microarreglos reportado por el mismo grupo, se identificaron los genes que se expresan durante el proceso de rehidratación después de sufrir una deshidratación severa en plantas de tres semanas de edad crecidas en cajas Petri. Nuevamente el cDNA correspondiente al gen *AtLEA4-5* se indujo significativamente durante el proceso de deshidratación y se reprimió durante el proceso de rehidratación, mientras que no se reportó un incremento significativo de la expresión de los otros dos miembros de la familia (Oono *et al.*, 2003). Lo anterior puede sugerir que dentro de la familia *AtLEA4* los transcritos que codifican para la *AtLEA4-5* tienen un papel más importante en la respuesta adaptativa de la planta ante estrés, mientras que los otros dos miembros se expresan en menor grado, ya que su detección sólo fue posible a través de RT-PCR, probablemente debido a que complementan la función llevada a cabo por el producto del gen *AtLEA4-5*.

Debido a que en su hábitat natural las plantas están sujetas a una combinación de tipos de estrés, en un análisis de transcriptomas se detectaron los cambios en la expresión genética de *Arabidopsis* en respuesta a sequía, calor y una combinación de ambos (Rhizhsky *et al.*, 2004). Se encontró que se indujeron 454 transcritos de manera específica en respuesta a una combinación de calor y sequía. Entre los transcritos que se indujeron en respuesta a sequía o a una combinación de sequía y calor, se encontró un incremento de 9 veces con respecto al control en los transcritos del gen *AtLEA4-5*, mientras que en los transcritos del gen *AtLEA4-1*, se encontró una inducción de más de 3 veces solamente en respuesta a la combinación de sequía y calor (Rhizhsky *et al.*, 2004). La inducción de los transcritos para la *AtLEA4-2* no se reportan en dicho trabajo.

LA PROTEÍNA AtLEA4-5 PARTICIPA EN LA RESPUESTA ADAPTATIVA DE LA PLANTA AL DEFICIT HIDRICO

Dentro del análisis funcional de la familia de hidrofílicas LEA4, se llevaron a cabo dos enfoques, el de la sobre-expresión y el silenciamiento del gen que codifica para la proteína AtLEA4-5. Uno de los antecedentes para la realización de este trabajo fueron los ensayos de protección *in vitro* realizados en nuestro laboratorio (Reyes *et al.*, 2004). En ellos se observó que la proteína AtLEA4-5 (denominada AtD-113 en dicho estudio), entre otras hidrofílicas analizadas, otorgaba protección a la actividad de enzimas como la malato y lactato deshidrogenasas en porcentajes de deshidratación severos, comparables con los que sufren organismos anhidrobióticos (99% de pérdida de agua). En esta tesis se demuestra que la sobre-expresión de la proteína AtLEA4-5 en *Arabidopsis* otorgó un fenotipo de tolerancia a situaciones de deshidratación severas, apoyando los resultados obtenidos *in vitro*. También es importante destacar que este es el primer estudio de sobre-expresión en plantas de una proteína de la familia LEA4, ya que anteriormente se ha reportado la sobre-expresión de proteínas de las familias LEA1, LEA2 y LEA3 en plantas, obteniendo fenotipos de tolerancia en plantas (Xu *et al.*, 1996; Sivamani *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2002). En *S. cerevisiae* se sobre-expresaron las proteínas LE25 de tomate, que pertenece a la familia LEA4 (Imai *et al.*, 1996) y la proteína EM de trigo, de la familia LEA1 (Swire-Clark y Marcotte, 1999), otorgando un fenotipo de osmotolerancia, pero su papel podría ser diferente cuando se expresan en un organismo unicelular comparado con su papel en las plantas. Por ejemplo, la expresión en levadura de la LE25 otorga un fenotipo de tolerancia a congelamiento y salinidad, pero en *Arabidopsis*, la AtLEA4-5 se acumula en menores niveles en respuesta a salinidad comparado con su expresión en respuesta a sequía y PEG, mientras que en respuesta a temperaturas bajas (pero no de congelamiento como en levadura) no se detectó la acumulación de proteína.

En condiciones normales de crecimiento la sobre-expresión de la proteína AtLEA4-5 no tuvo un efecto negativo en el desarrollo, es decir, las plantas mostraron fenotipos normales y el tiempo de floración fue similar al de plantas silvestres. En experimentos de sequía con plantas adultas, se observó un mayor contenido relativo de agua en las líneas transgénicas, es decir, la sobre-expresión de la proteína permite que los tejidos vegetativos sean capaces de retener más agua en situaciones de déficit hídrico. Esto también se vio reflejado en una mayor acumulación de biomasa y

producción de nuevas yemas florales después de un proceso de rehidratación de 10 días. Lo anterior sugiere que la presencia constitutiva de la proteína antes de sufrir el estrés promueve una mayor eficiencia en su protección durante la deshidratación, por lo que los tejidos son capaces de recuperarse mejor en el proceso de rehidratación. De manera semejante, en los experimentos de riego con PEG 25%, las líneas transgénicas tardaron más tiempo en mostrar fenotipos de marchitez en las hojas y los ejes caulinares permanecían erguidos en las plantas transgénicas, mientras que en las plantas silvestre estaban deshidratados en la misma intensidad de déficit hídrico. Se han reportado fenotipos similares al sobre-expresar el gen HVA1 de cebada, que codifica para una LEA de la familia 3 en plantas de arroz (Xu *et al.*, 1996; Sivamani *et al.*, 2000).

El efecto de la sobre-expresión también depende de los niveles de acumulación de proteína, ya que las líneas que la sobre-expresaban en mayores niveles eran las que generalmente mostraban diferencias más significativas con respecto a la silvestre. Esto sugiere que el efecto de la proteína es dependiente de la dosis. Con la finalidad de relacionar los parámetros cuantificados para los experimentos de sequía con plantas adultas de *Arabidopsis* que estuvieron bajo un periodo de sequía prolongado y posteriormente rehidratadas, se obtuvo un índice de sobrevivencia relacionando el porcentaje de sobrevivencia dividido entre el número de yemas florales, el cual indica que de acuerdo a los niveles de sobre-expresión de la proteína, las líneas que acumulan más proteína (2, 6 y 7), son las que presentan un mayor índice de sobrevivencia (Fig. 18).

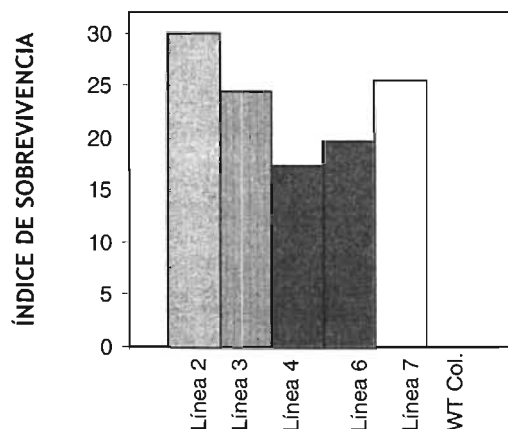


Figura 18. Análisis fenotípico de líneas transgénicas que sobre-expresan la proteína AtLEA4-5 en plantas adultas de *Arabidopsis thaliana*. Se aplicó un tratamiento de sequía por falta de riego durante dos semanas hasta alcanzar porcentajes de pérdida de agua en el sustrato del 80%. Se rehidrataron las plantas durante 10 días, al cabo de los cuales se cuantificó el número de plantas sobrevivientes, es decir, que presentaron la aparición de nuevas hojas de la roseta y la presencia/ausencia y número de yemas florales por planta. Se obtuvo un índice de sobrevivencia dividiendo el porcentaje de sobrevivencia entre el número de yemas florales por planta. Las barras indican el error estándar de 3 réplicas (macetas) para cada línea y para la silvestre.

Aunque la sobre-expresión de la proteína AtLEA4-5 se realizó bajo el control de un promotor de expresión constitutiva, (35S), las plantas transgénicas no mostraron efectos negativos en el crecimiento en condiciones control y en sequía. En plantas de *Arabidopsis* que sobre-expresan el factor transcripcional DREB1A bajo el control del mismo promotor, se observó que el crecimiento en condiciones de irrigación óptima de las plantas era menor comparado con el de plantas silvestres, en tanto que las plantas que expresan el factor transcripcional bajo el control de un promotor inducible por estrés, como el promotor del gen *rd29A*, tienen un crecimiento normal en irrigación óptima (Kasuga *et al.*, 1999). La sobre-expresión de un factor transcripcional activa la transcripción de un conjunto de genes, lo cual desencadena una respuesta diferente a la sobre-expresión de un gen no regulador, como es el caso de la AtLEA4-5. Sería conveniente desarrollar más trabajos de ingeniería genética que utilicen promotores inducibles para observar el fenotipo de plantas que sobre-expresen esta proteína LEA y otras proteínas de respuesta a estrés en donde se obtenga ventaja de la expresión simultánea de varias de estas proteínas, sin causar efectos secundarios en el crecimiento y productividad de las plantas debida a la producción constitutiva de proteínas.

Se detectó por análisis tipo Western que en las líneas transgénicas T₁ que llevan la construcción para desencadenar la degradación del RNA mensajero que codifica para la AtLEA4-5, hubo diferentes niveles de disminución en la acumulación de la proteína en condiciones de déficit hídrico, ya sea con iguales o menores niveles de acumulación comparados con la silvestre e incluso líneas con el silenciamiento completo del gen. En experimentos preliminares no se encontraron diferencias significativas en la sobrevivencia y producción de yemas florales nuevas después de rehidratar plantas adultas. Esto sugiere que las proteínas de la familia AtLEA4 presentan una redundancia funcional, y ante la falta de uno de los miembros que se expresan abundantemente en sequía, los otros dos miembros de la familia podrían aumentar su expresión para compensar la función de la otra, debido a lo cual no se pudieron detectar diferencias entre las líneas silenciadas y la silvestre. Para demostrar esta hipótesis sería necesario realizar experimentos de RT-PCR cuantitativo y de tipo Western para determinar los niveles de acumulación de transcrito y proteína de los otros dos miembros en las líneas silenciadas para la AtLEA4-5. Aunque los experimentos para ver el fenotipo de plantas silenciadas fueron semejantes a los realizados con las plantas que sobre-expresaban la proteína, existe la posibilidad de

que de las condiciones experimentales, como la velocidad de deshidratación del sustrato o la etapa del desarrollo analizada, no fueron las adecuadas para determinar el fenotipo de la ausencia de esta proteína.

METAS ALCANZADAS

- Se llevó a cabo un análisis bioinformático de la familia de proteínas LEA4 en diferentes especies vegetales, en el cual se rastrearon los cDNAs correspondientes a proteínas con similitud de secuencia a la AtLEA4-5, encontrando algunos representantes en gimnospermas, dicotiledóneas y monocotiledóneas. Estas secuencias se alinearon y agruparon en un árbol filogenético, y se encontraron firmas conservadas en estas proteínas con la finalidad de recabar información que pueda ser de utilidad en el análisis funcional de esta familia de proteínas.
- Se aislaron y clonaron las sondas para detectar los genes *AtLEA4-1* y *AtLEA4-2*. Se comprobó en experimentos tipo Southern que las sondas para cada miembro de la familia reconocen de manera específica al cDNA correspondiente.
- Se analizaron los patrones de acumulación de transcritos de la familia *AtLEA4* así como los patrones de acumulación de la proteína AtLEA4-5 en plantas silvestres de *Arabidopsis*. Estos patrones se analizaron durante la embriogénesis y en tejidos vegetativos en diferentes situaciones que provocan déficit hídrico en plantas.
- Se obtuvieron líneas transgénicas homocigotas que sobre-expresan el gen *AtLEA4-5* y se llevaron a cabo análisis fenotípicos para determinar el efecto de su sobre-expresión en experimentos de germinación en presencia de alta salinidad y alta osmolaridad, así como en plantas adultas sometidas a diferentes severidades de déficit hídrico y riego con PEG.
- Se transformaron plantas de *Arabidopsis* con una construcción que desencadena el silenciamiento del gen *AtLEA4-5*. Se obtuvieron líneas T₁ (mezcla de plantas homocigotas y heterocigotas para el transgen), con las cuales se llevaron a cabo experimentos de sequía con plantas adultas para comprobar su fenotipo. No se encontraron diferencias significativas con respecto a la silvestre a pesar de que en experimentos tipo Western realizados con estas plantas, se comprobó que había una disminución parcial y/o total en la expresión del gen durante sequía.

CONCLUSIONES

- Se encontraron representantes de la familia LEA4 en gimnospermas, dicotiledóneas y monocotiledóneas y se encontraron motivos conservados, los cuales no habían sido reportados para esta familia de proteínas.
- Durante la embriogénesis se detectaron los transcritos para los tres genes desde etapas tempranas en el desarrollo, y de manera abundante en las últimas etapas de formación de la semilla. La proteína AtLEA4-5 se acumula en flores y posteriormente se induce su acumulación en todas las etapas de la embriogénesis hasta la desecación de la semilla, en donde incrementa su abundancia.
- Se encontró que los tres miembros de la familia responden a ABA y déficit hídrico impuesto por sequía, altas concentraciones de iones (NaCl), osmolitos (PEG 25%) y bajas temperaturas, en todos los órganos analizados (con excepción del transcrito para el gen *AtLEA4-2* en flores). En el caso de la proteína AtLEA4-5 se encontró que se induce su acumulación en respuesta a ABA, sequía y tratamientos de PEG, mientras que los niveles de acumulación en respuesta a NaCl son muy bajos y no se detectan en respuesta a frío.
- Se encontraron diferencias estadísticamente significativas en líneas transgénicas T₂ que sobre-expresan la AtLEA4-5 con respecto a plantas silvestres en el contenido relativo de agua de plantas adultas expuestas a diferentes severidades de estrés, así como en el porcentaje de sobrevivencia y en la producción de yemas florales nuevas después de que las plantas que estuvieron en sequía fueron sometidas a un periodo de rehidratación de 10 días, al cabo del cual se cuantificaron estos parámetros.
- Se encontró que los niveles de sobre-expresión de la proteína AtLEA4-5 correlacionan con el incremento en la tolerancia al déficit hídrico, ya que las líneas que expresan en mayores niveles la proteína son las que mostraron una mejor adaptación durante y después del periodo de déficit hídrico.

**ESTA TESIS NO SALI
DE LA BIBLIOTECA**

PERSPECTIVAS

- Para tener un panorama completo de los patrones de acumulación de proteínas de la familia, se requiere producir los anticuerpos que permitan su detección, para poder así analizar el papel que estos otros dos miembros tienen en la respuesta adaptativa de la planta durante déficit hídrico comparado con el de la proteína AtLEA4-5.
- Sería conveniente analizar en las plantas silenciadas para el gen *AtLEA4-5* si hay cambios en la expresión de los otros dos genes que conforman la familia, para determinar si la ausencia de fenotipo se debe a un mecanismo de compensación por parte de estos otros dos genes.
- Se podrían obtener plantas transgénicas que no produzcan ninguna de las proteínas de la familia AtLEA4, cruzando las plantas que ya se tienen silenciadas en el gen *AtLEA4-5* con otras líneas de mutantes por inserción de T-DNA o que estén silenciadas para los otros dos genes.
- Sería muy interesante conocer cuál o cuáles son los blancos con los que interactúa la familia de proteínas tanto durante la embriogénesis como en respuesta a déficit hídrico en tejidos vegetativos.

REFERENCIAS

1. Abe, H.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Urao, T.; Iwasaki, T.; Hosokawa, D. & Shinozaki, K. (1997). Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologues in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* **9**: 1859-1868.
2. Abe, H.; Urao, T.; Ito, T.; Seki, M.; Shinozaki, Y. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* **15**: 63-78.
3. Allan, A.C. & Trewavas, A.J. (1994). Abscisic acid and gibberellin perception: inside or out? *Plant Physiology* **104**: 1107-1108.
4. Amann, E.; Ochs, B. & Abel, K.J. (1988). Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* **69**: 301-15.
5. Apse, M.P.; Aharon, G.S.; Snedden, W.A. & Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* **285**: 1256-1258.
6. Artus, N.N.; Uemura, M.; Steponkus, P.L.; Gilmour, S.J.; Lin, C. & Thomashow, M.F. (1996) Constitutive expression of the cold-regulated *Arabidopsis thaliana* COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**: 13404-13409.
7. Babu, R.C.; Zhang, J.; Ho, D.; Wu, R. & Nguyen H.T. (2004). *HVA1*, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Science* **166**: 855-962.
8. Bajaj, S.; Targolli, J.; Liu, L.; Ho, D. & Wu, R. (1999). Transgenic approaches to increase dehydration-stress tolerance in plants. *Molecular Breeding* **5**: 493-503.
9. Battista, J.R.; Mie-Jung, P. & McLemore, A. (2001). Inactivation of two homologues of proteins presumed to be involved in the desiccation tolerance of plants sensitizes *Deinococcus radiodurans* R1 to desiccation. *Cryobiology* **43**: 133-139.
10. Bies, N.; Aspart, L.; Carles, C.; Gallois, P. & Delseny, M. (1998). Accumulation and degradation of Em proteins in *Arabidopsis thaliana*; evidence for post-transcriptional controls. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1925-1933.
11. Bechtold, N.; Ellis, J. & Pelletier, G. (1993). *In planta* *Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Academy of Sciences Paris Sci. Vie/Life Sci.* **316**: 1194-1199.
12. Bordas, M.; Montesinos, C.; Debauza, M., Salvador, A.; Roig, L.A.; Serrano, R. & Moreno, V. (1997) Transfer of the yeast salt tolerance gene HAL1 to *Cucumis melo* L. cultivars and in vitro evaluation of salt tolerance. *Transgenic Research* **6**: 41-50.
13. Boyer, J.S. (1982). Plant productivity and environment. *Science* **218**: 443-448.
14. Bray, E.A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in Plant Science* **2**: 48-54.
15. Bray, E.A.; Bailey-Serres, J. & Weretilnyk, E. (2000). Response to Abiotic Stresses. En: Buchanan, B.; Gruissem, W. & Jones, R. (eds), *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, M.D. Pp: 1158-1203.
16. Browne, J.; Tunnacliffe, A. & Burnell, A. (2002). Plant desiccation gene found in a nematode. *Nature* **416** :38.
17. Campalans, A.; Messegue, R.; Goday, A & Pagès, M. (1999). Plant responses to drought, from ABA signal transduction events to the action of the induced proteins. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 327-340.
18. Chazen, O. & Neumann, P.M. (1994). Hydraulic signals from the roots and rapid cell wall hardening in growing maize (*Zea mays* L.) leaves are primary responses to polyethylene glycol-induced water deficit. *Plant Physiology* **104**: 1385-1392.
19. Chen, R.D.; Yu, L.X.; Greer, A.F.; Cheriti, H & Tabaeizadeh, Z. (1994). Isolation of an osmotic stress- and abscisic acid-induced gene encoding an acidic endochitinase from *Lycopersicon chilense*. *Molecular and General Genetics* **245**:195-202.
20. Chen, C.N.; Chiang, Y.C.; Ho, D.; Schaal, B.A. & Chiang, T.Y. (2004). Coalescent processes and relaxation of selective constraints leading to contrasting diversity at paralogs *AtHVA22d* and *AtHVA22e* in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and Phylogenetics Evolution* **32**: 616-626.

21. Cheng, Z.; Targolli, J.; Huang, X. & Wu, R. (2002). Wheat LEA genes, PMA80 and PMA1959, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Molecular Breeding* **10**: 71-82.
22. Chinnusamy, V.; Ohta, M.; Kanrar, S.; Lee, B.H.; Hong, X.; Agarwal, M. & Zhu, J.K. (2003) ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in Arabidopsis. *Genes & Development* **17**: 1043-1054.
23. Choi, H.I.; Hong, J.H.; Ha, J.; Kang, J.Y. & Kim, S.Y. (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 1723-1730.
24. Chuang, C. & Meyerowitz, E. (2000). Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 4985-4990.
25. Clough, S.J. & Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **16**: 735-743.
26. Colmenero-Flores, J.M.; Campos, F.; Garcarrubio, A. & Covarrubias, A.A. (1997). Characterization of *Phaseolus vulgaris* cDNA clones responsive to water deficit: identification of a novel late embryogenesis abundant-like protein. *Plant Molecular Biology* **35**: 393-405.
27. Colmenero-Flores, J.M.; Moreno, L.P.; Smith, C. & Covarrubias, A.A. (1999). Pvlea-18, a member of a new late-embryogenesis abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well irrigated bean seedlings. *Plant Physiology* **120**: 93-103.
28. Covarrubias, A.A.; Ayala, J.W.; Reyes, J.L.; Hernández, M. & Garcarrubio, A. (1995). Cell wall proteins induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings. *Plant Physiology* **107**: 1119-1128.
29. 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.
30. Dalmay, T.; Hamilton, A.; Rudd, S.; Angell, S. & Baulcombe, D. (2000). An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* **101**: 543-553.
31. Davison, P.A.; Hunter, C.N. & Horton, P. (2002) Overexpression of β -carotene hydroxylase enhances stress tolerance in *Arabidopsis*. *Nature* **418**: 203-206.
32. Delseny, M.; Bies-Etheve, N.; Carles, C.; Hull, G.; Vicient, 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.
33. Dubouzet, J.G.; Sakuman, Y.; Ito, Y.; Kasuga, M.; Dubouzet, E.G.; Miura, S.; Seki, M.; Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2003). OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold responsive gene expression. *Plant Journal* **33**: 751- 763.
34. Dure, L. III (1993). Structural motifs in LEA proteins. En: Close, T & Bray, E. (eds), *Plant responses to cellular dehydration during environmental stress*. The American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD. Pp. 91-103.
35. Ermolaeva, M.; Wu, M.; Eisen, J.A. & Salzberg, S.L. (2003). The age of the *Arabidopsis thaliana* genome duplication. *Plant Molecular Biology* **51**: 859-866.
36. Escobar, M.; Civerolo, E.; Summerfelt, K. & Dandekar, A. (2001). RNAi-mediated oncogene silencing confers resistance to crown gall tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**: 13437-13442.
37. Finkelstein, R.R. & Lynch, T.J. (2000). The *Arabidopsis* abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* **12**: 599-609.
38. Finkelstein, R.R.; Gampala, S.S. & Rock, C.D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell Supplement* **14**: S15-S45.
39. Fire, A.; Xu, S.; Montgomery, M.; Kostas, S.; Driver, S. & Mello, C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.

40. Galau, G.A.; Wang, H.Y.C. & Hughes, D.W. (1993). Cotton *Lea5* and *Lea14* encode atypical late embryogenesis-abundant proteins. *Plant Physiology* **101**: 695-696.
41. Garay-Arroyo, A.; Colmenero-Flores, J.M.; Garcarrubio, A. & Covarrubias, A.A. (2000). Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry* **275**: 5668-5674.
42. García-Gómez, B.I.; Campos, F.; Hernández, M. & Covarrubias, A.A. (2000). Two bean cell wall proteins more abundant during water deficit are high in proline and interact with plasma membrane protein. *Plant Journal* **22**: 277-288.
43. Garg, A.K.; Kim, J.K.; Owens, T.G.; Ranwala, A.P.; Choi, Y.D.; Kochian, L.V. & Wu, R.J. (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **99**: 15898-15903.
44. Gaxiola, R.A.; Rao, R.; Sherman, A.; Grisafi, P.; Alper, S.L. & Fink, G.R. (1999). The *Arabidopsis thaliana* proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **96**: 1480-1485.
45. Gaxiola, R.A.; Li, J.; Undurraga, S.; Dang, L.M.; Allen, G.J.; Alper, S.L. & Fink, G.R. (2001). Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**:11444-1449.
46. Gilmour, S.J.; Zarka, D.G.; Stockinger, E.J.; Salazar, M.P.; Houghton, J.M. & Thomashow, M.F. (1998). Low temperature regulation of the Arabidopsis CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant Journal* **16**: 433-442.
47. Gilmour, S.J.; Sebolt, A.M.; Salazar, M.P.; Everard, J.D. & Thomashow, M.F. (2000). Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiology* **124**:1854-1865.
48. Gleave, A.P. (1992). A versatile binary vector system with a T-DNA organisational structure conducive to efficient integration of cloned DNA into the plant genome. *Plant Molecular Biology* **20**: 1203-1207.
49. Goday, A.; Jensen, A.; Culiáñez-Macià, F.A.; Albà, M.M.; Figueras, M.; Serratos, J.; Torrent, M. & Pagés, M. (1994). The maize abscisic acid responsive protein RAB17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell* **6**: 351-360.
50. Goyal, K.; Tisi, L.; Basran, A.; Browne, J.; Burnell, A.; Zurdo, J. & Tunnacliffe, A. (2003). Transition from natively unfolded to folded state induced by desiccation in an anhydrobiotic nematode protein. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 12977-12984.
51. Gupta, A.S.; Heinen, J.L.; Holaday, A.S.; Burke, J.J. & Allen, R.D. (1993a). Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **90**: 1629-1633.
52. Gupta, A.S.; Webb, R.P.; Holaday, A.S. & Allen, R.D. (1993b). Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress. *Plant Physiology* **103**: 1067-1073.
53. Haake, V.; Cook, D.; Riechmann, J.L.; Pineda, O.; Thomashow, M.F. & Zhang, J.Z. (2002). Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis. *Plant Physiology* **130**: 639-648.
54. Hamilton, A. & Baulcombe, D. (1999). A novel species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing. *Science* **286**: 950-952.
55. Hamilton, A.; Voinnet, O.; Chappell, L. & Baulcombe, D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *European Molecular Biology Organization Journal* **21**: 4671-4679.
56. Hayashi, H.A.; Mustardy, L.; Deshnum, P.; Ida, M. & Murata, N. (1997). Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase: accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant Journal* **12**: 133-142.

57. Hayashi, H.A.; Chen, T.H.H. & Murata, N. (1998). Transformation with a gene for choline oxidase enhances the cold tolerance of *Arabidopsis* during germination and early growth. *Plant, Cell & Environment* **21**: 232-239.
58. Henikoff, S. & Henikoff, J.G. (1992). Amino acid substitution matrices from protein blocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **89**: 10915-9.
59. Hoekstra, F.; Golovina, E. & Buitink, J. (2001). Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* **6**: 431-438.
60. Hong, Z.; Lakkineni, K.; Zhang, K. & Verma, D.P.S. (2000). Removal of feedback inhibition of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress. *Plant Physiology* **122**: 1129-1136.
61. Horvath, D.P.; McLarney, B.K. & Thomashow, M.F. (1993). Regulation of *Arabidopsis thaliana* L. (Heyn) *cor78* in response to low temperature. *Plant Physiology* **103**: 1047-1053.
62. Hsieh, T.H.; Lee, J.T.; Yang, P.T.; Chiu, L.H.; Charng, Y.Y.; Wang, Y.C. & Chan, M.T. (2002a) Heterology expression of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiology* **129**: 1086-1094.
63. Hsieh, T.H.; Lee, J.T.; Charng, Y.Y. & Chan, M.T. (2002b) Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress. *Plant Physiology* **130**: 618-626.
64. Hurkman, W. & Tanaka, C. (1986). Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiology* **81**: 802-806.
65. Imai, R.; Chang, L.; Ohta, A.; Bray, E. & Takagi, M. (1996). A lea-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **170**: 243-248.
66. Ingram, J. & Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 377-403.
67. Iwasaki, T.; Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (1995). Identification of a *cis* regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Molecular and General Genetics* **247**: 391-398.
68. Jaglo K.R.; Kleff, S.; Amundsen, K.L.; Zhang, X.; Haake, V.; Zhang, J.Z.; Deits, T. & Thomashow, M.F. (2001). Components of the *Arabidopsis* C-repeat/dehydration-responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiology* **217**: 910-917.
69. Jaglo-Ottosen, K.R.; Gilmour, S.J.; Zarka, D.G.; Schabenberger, O. & Thomashow, M.F. (1998). *Arabidopsis* CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* **280**:104-106.
70. Jepson, S.G & Close, T. (1995). Purification of a maize dehydrin protein expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **6**: 632-636.
71. Jones-Rhoades, M.W. & Bartel, D.P. (2004). Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell* **14**: 787-799.
72. Kader, J.C. (1996). Lipid-transfer proteins in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 627-654.
73. Kang, J.Y.; Choi, H.I.; Im, M.Y. & Kim, S.Y. (2002). *Arabidopsis* basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* **14**: 343-357.
74. Kasuga, M.; Liu, Q.; Miura, S.; Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* **17**: 287-291.
75. Kishor, K.P.B.; Hong, Z.; Miao, G.H.; Hu, C.A.A. & Verma, D.P.S. (1995). Overexpression of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase increase proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. *Plant Physiology* **108**: 1387-1394.
76. Kizis, D.; Lumberras, V. & Pagès, M. (2001). Role of AP2/EREBP transcription factors in gene regulation during abiotic stress. *FEBS Letters* **498**: 187-189.

77. Knight, H. & Knight, M.R. (2001). Abiotic stress signaling pathways: specificity and cross-talk. *Trends in Plant Science* **6**: 262-267.
78. Koag, M.C.; Fenton, R.D.; Wilkens, S. & Close, T. (2003). The binding of maize DHN1 to lipid vesicles. Gain of structure and lipid specificity. *Plant Physiology* **131**: 309-316.
79. Koorneef, M.; Leon-Kloosterziel, K. M.; Schuartz, S.H. & Zeevaart, J.A.D. (1988). The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**: 83-89.
80. Lai, E.C. (2003). microRNAs: runts of the genome assert themselves. *Current Biology* **13**: R925-R936.
81. Laurie, S.; Feeney, K.A.; Maathuis, F.J.; Heard, P.J.; Brown, S.J. & Leigh, R.A. (2002). A role for HKT1 in sodium uptake by wheat roots. *Plant Journal* **32**: 139-149.
82. Lee, J.H.; Hübel, A. & Schöffl, F. (1995). Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermotolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Journal* **8**: 603-612.
83. Lian, H.L.; Yu, X.; Ye, Q.; Ding, X.S.; Kitagawa, Y.; Kwak, S.S.; Su, W.A. & Tang, Z. (2004). The role of aquaporin RWC3 in drought avoidance in rice. *Plant & Cell Physiology* **45**: 481-489.
84. Lillie, S.H. & Brown, S.S. (1987). Artfactual immunofluorescent labeling in yeast, demonstrated by affinity purification of antibody. *Yeast* **3**: 63-70.
85. Lisse, T.; Bartels, D.; Kalbitzer, H.R. & Jaenicke, R. (1996). The recombinant dehydrin-like desiccation stress protein from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* displays no defined three-dimensional structure in its native state. *Biological Chemistry* **377**: 555-567.
86. Liu, Q.; Kasuga, M.; Sakuma, Y.; Abe, H.; Miura, S.; Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREB/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.
87. Lynch, M. & Conery, J.S. (2000). The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* **290**: 1151-1154.
88. Maurel, C. & Chrispeels, M.J. (2001). Aquaporins: a molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology* **125**: 135-138.
89. McCubin, W.D. & Kay, C.M. (1985). Hydrodynamics and optical properties of the wheat Em protein. *Journal of Biochemistry* **63**: 803-810.
90. McGuffin L.J.; Bryson, K. & Jones DT. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**:404-405.
91. McKersie, B.D.; Bowley, S.R.; Harjanto, E. & Leprince, O. (1996). Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiology* **111**: 1177-1181.
92. McKersie, B.D.; Bowley, S.R. & Jones, K.S. (1999). Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase. *Plant Physiology* **119**: 839-848.
93. McKersie, B.D.; Murnaghan, J.; Jones, K.S. & Bowley, S.R. (2000). Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance. *Plant Physiology* **122**: 1427-1438.
94. Milborrow, B.V. (2001). The pathway of biosynthesis of abscisic acid in vascular plants: a review of the present state of knowledge of ABA biosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **52**: 1145-1164.
95. Mishra, S.K.; Tripp, J.; Winkelhaus, S.; Tschiersch, B.; Theres, K.; Nover, L. & Scharf, K.D. (2002). In the complex family of heat stress transcription factors, HsfA1 has a unique role as master regulator of thermotolerance in tomato. *Genes & Development* **16**: 1555-1567.
96. Mlotshwa, S.; Voinnet, O.; Mette, M. F.; Matzke, M.; Vaucheret, H.; Ding, S.; Pruss, G. & Vance, V. (2002). RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell* **S289-301**, Supplement 2002.
97. Mourrain, P.; Béclin, C.; Elmayan, T.; Feuerbach, F.; Godon, C.; Morel, J.; Jouette, D.; Lacombe, A.; Nikic, S.; Picault, N.; Remoue, K.; Sanial, M.; Vo, T. & Vaucheret, H.

- (2000). *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* **101**: 533-542.
98. Moreno-Fonseca, L.P. & Covarrubias, A.A. (2001). Downstream DNA sequences are required to modulate *Pvlea-18* gene expression in response to dehydration. *Plant Molecular Biology* **45**: 501-515.
 99. Mudgett, M.B. & Clarke, S. (1994). Hormonal end environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in wheat. *Journal of Biological Chemistry* **269**: 25605-25612.
 100. Napoli, C.; Lemieux, C. & Jorgensen, R. (1990). Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in *trans*. *Plant Cell* **2**: 279-289.
 101. Ndong, C.; Danyluk, J.; Wilson, K.E.; Pocock, T.; Huner, N.P.A. & Sarhan, F. (2002). Cold-regulated cereal chloroplast late embryogenesis abundant-like proteins. Molecular characterization and functional analyses. *Plant Physiology* **129**:1368-1381.
 102. Nishio, N., & Satoh, H. (1997). A water-soluble chlorophyll protein in cauliflower may be identical to BnD22, a drought-induced 22-kilodalton protein in rapeseed. *Plant Physiology* **115**: 841-846.
 103. Notredame, C.; Higgins D. & Heringa, J. (2000). T-Coffee: A novel method for multiple sequence alignments. *Journal of Molecular Biology* **302**: 205-217.
 104. Nylander, M.; Svensson, J.; Palva, E.T. & Wellin, B.V. (2001). Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **45**: 263-279.
 105. Oberschall, A., Deák, M.; Török, K.; Sass, L.; Vass, I.; Kovács, I.; Fehér, A.; Dudits, D. & Horváth, G.V. (2000). A novel aldose/aldehyde reductase protects transgenic plants against lipid peroxidation under chemical and drought stresses. *Plant Journal* **24**: 437-446.
 106. Oono, Y.; Seki, M.; Nanjo, T.; Narusaka, M.; Fujita, M.; Satoh, R.; Satou, M.; Sakurai, T.; Ishida, J.; Akiyama, K.; Iida, K.; Maruyama, K.; Satoh, S.; Yamaguchi-Shinozaki, K. & Shinozaki, K. (2003). Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca. 7000 full-length cDNA microarray. *Plant Journal* **34**: 868-887.
 107. Owens, C.L.; Thomashow, M.F.; Hancock, J.F. & Lezzoni, A.F. (2002) CBF1 orthologs in sour cherry and strawberry and the heterologous expression of CBF1 in strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* **127**: 489-494.
 108. Pandey, G.K.; Cheong, Y.H.; Kim, K.N.; Grant, J.J.; Li, L.; Hung, W.; D'Angelo, C.; Weinl, S.; Kudla, J. & Luan, S. (2004). The calcium sensor calcineurin B-like 9 modulates abscisic acid sensitivity and biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**: 1912-1924.
 109. Pellegrineschi, A.; Reynolds, M.; Pacheco, M.; Brito, R.M.; Almeraya, R.; Yamaguchi-Shinozaki, K. & Hoisington, D. (2004). Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* *DREB1A* gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. *Genome* **47**: 493-500.
 110. Perruc, E.; Charpentreau, M.; Ramírez, B.C.; Jauneau, A.; Galaud, J.P. ; Ranjeva, R. & Ranty, B. (2004). A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Journal* **38**: 410-420.
 111. Pilon-Smiths, E.A.H.; Ebskamp, M.J.M.; Paul, M.J.; Jeuken, M.J.W.; Weisbeek, P.J. & Smeekens, S.C.M. (1995). Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiology* **107**: 125-130.
 112. Pinyopich, A.; Ditta, G.S.; Savidge, B.; Liljegren, S.J.; Baumann, E.; Wisman, E. & Yanofsky, M.F. (2003). Assessing the redundancy of MADS-box genes during carpel and ovule development. *Nature* **424**: 85-88.
 113. Prändl, R.; Hinderhofer, K.; Eggers-Schumacher, G. & Schöffl, F. (1998). HSF3, a new heat shock factor from *Arabidopsis thaliana*, derepresses the heat shock response and confers thermotolerance when overexpressed in transgenic plants. *Molecular & General Genetics* **258**: 269-278.

114. Pruvot, G.; Cuiné, S.; Peltier, G. & Rey, P. (1996). Characterization of a novel drought-induced 34kDa protein located in the tylakoids of *Solanum tuberosum* L. *Plants. Planta* **198**: 471-479.
115. Ramanjulu, S. & Bartels, D. (2002). Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell and Environment* **25**: 141-151.
116. Reichman, J.L.; Heard, J.; Martin, G.; Reuber, L.; Jiang, C.; Keddie, J.; Adam, L.; Pineda, O.; Ratcliffe, O.J. & Samaha, R.R. (2000). *Arabidopsis* transcription factors: genome-wide comparative analysis among eucaryotes. *Science* **290**:2105-2110.
117. Rey, P.; Pruvot, G.; Becuwe, N.; Eymery, F.; Rumeau, D. & Peltier, G.A. (1998). A novel thioredoxin-like protein located in the chloroplast is induced by water deficit in *Solanum tuberosum* L. plants. *Plant Journal* **13**:97-107.
118. Reyes, J.L.; Rodrigo, M.J.; Colmenero-Flores, J.M.; Gil, J.V.; Salamini, F.; Bartels, D. & Covarrubias, A.A. (2004). Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation *in vitro*. En prensa
119. Rhizhsky, L.; Liang, H.; Shuman, J.; Shulaev, V.; Davletova, S. & Mittler, R. (2004). When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* **134**: 1683-1696.
120. Ried, J.L. & Walker-Simmons, M.K. (1993). Group 3 late embryogenesis abundant proteins in desiccation-tolerant seedlings of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Physiology* **102**: 125-131.
121. Roberts J.; DeSimone, N.; Lingle, W. & Dure, L.III (1993). Cellular concentrations and uniformity of cell-type accumulation of two LEA proteins in cotton embryos. *Plant Cell* **5**: 769-780.
122. Romero, C.; Bellés, J.M.; Vayá, J.L.; Serrano, R. & Culiáñez-Macià, F.A. (1997). Expression of the yeast *trehalose-6-phosphate synthase* gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta* **201**: 293-297.
123. Roxas, V.P.; Smith, R.K. Jr.; Allen, E.R. & Allen, R.D. (1997). Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. *Nature Biotechnology* **15**: 988-991.
124. Rus, A.M.; Estaño, M.T.; Gisbert, C.; Garcia-Sogo, B.; Serrano, R.; Caro, M.; Moreno, V. & Bolarín, M.C. (2001). Expressing the yeast HAL1 gene in tomato increases fruit yield and enhances K⁺/Na⁺ selectivity under salt stress. *Plant, Cell & Environment* **24**: 875-880.
125. Sakamoto, A.; Murata, A. & Murata, N. (1998). Metabolic engineering of rice leading to biosynthesis of glycine betaine and tolerance to salt and cold. *Plant Molecular Biology* **38**: 1011-1019.
126. Schägger, H. & Von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* **166**: 368-379.
127. Schneider, K.; Wells, B.; Schmelzer, E.; Salamini, F. & Bartels, D. (1993). Dessication leads to the rapid accumulation of both cytosolic and chloroplastic proteins in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Planta* **189**:120-131.
128. Schweizer, P.; Pokorny, J.; Schulze-Lefert, P. & Dudler, P. (2000). Double-stranded RNA interferes with gene function at the single-cell level in cereals. *Plant Journal* **24**: 895-903. Seki, M.; Narusaka, M.; Ishida, J.; Nanjo, T.; Fujita, M.; Oono, Y.; Kamiya, A.; Nakajima, M.; Enju, A.; Sakurai, T.; Satou, M.; Akiyama, K.; Taji, T.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Carninci, P.; Kawai, J.; Hayashizaki, Y. & Shinozaki, K. (2002). Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray. *Plant Journal* **31**: 279-292.
129. Serrano, R.; Mulet, J.M.; Rios, G.; Marquez, J.A.; de Larrinoa, I.F.; Leube, M.P.; Merizabal, I.; Pascual-Ahuir, A.; Proft, M.; Ros, R. & Montesinos, C. (1999). A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1023-1036.
130. Shi, H.; Ishitani, M.; Kim, C. & Zhu, J.K. (2000). The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **97**: 6896-6901.

131. Shi, H.; Lee, B.H.; Wu, S.J. & Zhu, J.K. (2003). Overexpression of a plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter gene improves salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Biotechnology* **21**: 81-85.
132. Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 217-223.
133. Sivamani, E.; Bahieldin, A.; Wraithc, J.M.; Al-Niemia, T.; Dyera, W.E.; Hod, T.H.D. & Wu, R. (2000) Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic rice constitutively expressing the barley HVA1 gene. *Plant Science* **155**: 1-9.
134. Smirnov, N. (1998). Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* **9**: 214-219.
135. Smith, N.; Singh, S.; Wang, M.; Stoutjesdijk, P.; Green, A. & Waterhouse, P. (2000). Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**: 319-320.
136. Solomon, A.; Solomon, R.; Paperna, I. & Glazer, I. (2000). Desiccation stress of entomopathogenic nematodes induces the accumulation of a novel heat-stable protein. *Parasitology* **121**: 409-416.
137. Soulages, J.L.; Kim, K.; Walters, C. & Cushman, J.C. (2002). Temperature-induced extended helix/random coil transitions in a group 1 late embryogenesis-abundant protein from soybean. *Plant Physiology* **128**: 822-832.
138. Steponkus, P.L.; Uemura, M.; Joseph, R.A.; Gilmour, S. & Thomashow, M.F. (1998). Mode of action of the COR15a gene on the freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95**:14570-14575.
139. Strimmer, K. & von Haeseler, A. (1996). Quartet puzzling: A quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies. *Mol. Biol. Evol.* **13**: 964-969.
140. Sun, W.; Bernard, C.; van der Cotte, B.; Van Montagu, M. & Verbruggen, N. (2001). At-HSP17.6A, encoding a small heat-shock protein in *Arabidopsis*, can enhance osmotolerance upon overexpression *Plant Journal* **27**: 407-415.
141. Swire-Clark, G.A. & Marcotte, W.R. (1999). The wheat LEA protein Em functions as an osmoprotective molecule in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Molecular Biology* **39**: 117-128.
142. Taiz, L. & Zeiger, E. (1991). *Plant Physiology*. The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc. 565 pp.
143. Tarczynski, M.C.; Jensen, R.G. & Bohnert, H.J. (1993). Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science* **259**: 508-510.
144. Tezara, W.; Mitchell, V.; Driscoll, S.P. & Lawlor, D.W. (2002). Effects of water deficit and its interaction with CO₂ supply on the biochemistry and physiology of photosynthesis in sunflower. *Journal of Experimental Botany* **53**:1781-1791.
145. Thomas, J.C.; Sepahi, M.; Arendall, B. & Bohnert, H.J. (1995). Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment* **18**: 801-806.
146. Tijsterman, M.; Ketting, R. & Plasterk, R. (2002). The genetics of RNA silencing. *Annual Review of Genetics* **36**: 489-519.
147. Tompa, P. (2002). Intrinsically unstructured proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **27**: 527-533.
148. Torres-Schuman, S.; Godoy, J.A. & Pintor-Toro, J.A. (1992). A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants. *Plant Molecular Biology* **18**: 749-757.
149. 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 Sciences of the USA* **97**: 11632-11637.
150. Urao, T.; Yakubov, B.; Satoh, R.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Seki, B.; Hirayama, T. & Shinozaki, K. (1999). A transmembrane hybrid-type histidine kinase in *Arabidopsis* functions as an osmosensor. *Plant Cell* **11**: 1743-1754.

151. Uversky, V.N. (2002a). Natively unfolded proteins: a point where biology waits for physics. *Protein Science* **11**: 739-756.
152. Uversky, V.N. (2002b). What does it mean to be natively unfolded? *European Journal of Biochemistry* **269**: 2-12.
153. van der Weele, C.; Spollen, W.; Sharp, R. & Baskin, T. (2000). Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1555-1562.
154. van Camp, W.; Capiou, K.; Van Montagu, M.; Inze, D. & Sloaten, L. (1996). Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts. *Plant Physiology* **112**: 1703-1714.
155. Vance, V. & Vaucheret, H. (2001). RNA silencing in plants-defense and counterdefense. *Science* **292**: 2277-2280.
156. Vaucheret, H.; Béclin, C. & Fagard, M. (2001). Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science* **114**: 3083-3091.
157. Vicient, C.M. & Delseny, M. (1999). Isolation of total RNA from *Arabidopsis thaliana* seeds. *Analytical Biochemistry* **268**:412-413.
158. Vierling, E. (1991). The roles of heat-shock proteins in plants. *Annual Review of Plant Biology* **42**: 579-620.
159. Wagner, A. (2001). Birth and death of duplicated genes in completely sequenced eukaryotes. *Trends in Genetics* **17**: 237-239.
160. Wang, M. & Waterhouse, P. (2001). Application of gene silencing in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 146-150.
161. Wang, W.; Vinocur, V. & Altman, A. (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**:1-14.
162. Wang, X.J.; Reyes, J.L.; Chua, N.H. & Gaasterland, T. (2004). Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biology* **5**: R65.
163. Waterhouse, P.; Graham, M. & Wang, M. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **95**: 13959-13964
164. Waters, E.R.; Lee, G.J. & Vierling, E. (1996). Evolution, structure and function of the small heat shock proteins in plants. *Journal of Experimental Botany* **47**: 325-338.
165. Wesley, V.; Helliwell, C.; Smith, N.; Wang, M.; Rouse, D.; Liu, Q.; Gooding, P.; Singh, S.; Abbott, D.; Stoutjesdijk, P.; Robinson, S.; Gleave, A.; Green, A. & Waterhouse, P. (2001). Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant Journal* **27**: 581-590.
166. Wise, M.J. & Tunnacliffe, A. (2004). POPP the question: what *do* LEA proteins do? *Trends in Plant Science* **9**:13-17.
167. Wright, P.E. & Dyson, J.H. (1999). Intrinsically unstructured proteins: re-assessing the protein-structure function paradigm. *Journal of Molecular Biology* **293**:321-331.
168. Xiong, L.X.; Schumaker, K.S. & Zhu, J.K. (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell Supplement 2002*: S165-S183.
169. Xu, D.; Duan, X.; Wang, B.; Hong, B.; Ho, T.D. & Wu, R. (1996). Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. *Plant Physiology* **110**: 249-257.
170. Yamaguchi-Shinozaki, K.; Koizumi, M.; Urao, S. & Shinozaki, K. (1992). Molecular cloning and characterization of 9 cDNAs for genes that are responsive to desiccation in *Arabidopsis thaliana*: sequence analysis of one clone that encodes a putative transmembrane channel protein. *Plant Cell Physiology* **33**:217-224.
171. 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.
172. Zamore, P.; Tuschl, T.; Sharp, P. & Bartel, D. (2000). RNAi: double stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* **101**:25-33.

173. Zamore, P. (2001). RNA interference: listening to the sound of silence. *Nature Structural Biology* **8**: 746-750.
174. Zhang, H.X. & Blumwald, E. (2001). Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology* **19**: 765-768.
175. Zhang, H.X.; Hodson, J.N.; Williams, J.P.; Blumwald, E. (2001). Engineering salt-tolerant *Brassica napus* plants: characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **98**: 12832-12836.
176. Zhu, B.; Chang, M.C.; Verma, D.P.S.; Fan, Y.L. & Wu, R. (1998). Overexpression of a Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene and analysis of tolerance to water- and salt-stress in transgenic rice. *Plant Science* **139**: 41-48.