



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Mecanismo de la regulación mediada por ABA sobre  
la expresión de un gen *LEA* inducido por sequía.

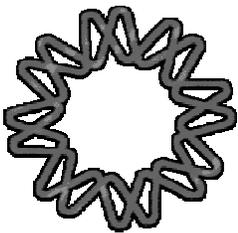
Tesis para obtener el grado de  
Maestra en Ciencias Bioquímicas

presenta

Q.F.B. Ericka Jiménez Candelario

Directora de Tesis

Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles





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.

Este proyecto fue realizado en el Departamento de Biología Molecular de Plantas del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la dirección de la Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles y la supervisión de los siguientes miembros de la comisión revisora de tesis:

Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles

Dra. Gladys Ileana Cassab López

Dra. Helena Porta Ducoing

Dra. Martha Patricia Coello Coutiño

Dr. Luis Cárdenas Torres

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT).

---

A mis padres, hermano  
y a mi sobri lindo

---

## AGRADECIMIENTOS

---

A mis padres por el apoyo incondicional brindado durante mi estancia fuera de casa, por la paciencia, el tiempo, los ánimos, las tantas alegrías y principalmente por el amor que me han dado siempre.

A mi hermano por sus buenos consejos y por darme esa lucecita que me ha llenado de felicidad.

A Ale por todas sus enseñanzas, motivaciones, su paciencia, humildad, dedicación, buenos consejos y sobre todo por brindarme su apoyo y su mejor sonrisa aún en los momentos más complicados. Gracias Ale.

A mis compañeros de laboratorio Caty, Pepe, Marina, Yadis, Rosy, Anita, Sonia, Marypaz, Erika, Lucero, Bety, Fernando, Carlos y Daniel por brindarme su amistad, su mejor sonrisa siempre, su humildad, su ayuda y por hacerme pasar muchos buenos momentos dentro y fuera del lab.

A mis amig@s por estar al pendiente de mí, por tener siempre un buen consejo y tiempo para escucharme siempre que lo necesité.

# INDICE

<b>RESUMEN</b>	
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
I. EL DÉFICIT HIDRICO Y SU EFECTO EN LAS PLANTAS	
REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA EN RESPUESTA AL DÉFICIT HIDRICO	<b>2</b>
II.1 Percepción del estrés	
II.2 Transducción de la señal	
- Respuesta dependiente de ABA	
- Respuesta independiente de ABA	
II.3 Regulación transcripcional en respuesta al estrés	
II.4 Participación del ABA en la respuesta a estrés y a desarrollo	
II.5 Participación del ABA en la regulación genética durante la maduración de la semilla	
II.6 Participación del ABA en la regulación durante la germinación y la etapa de establecimiento de la plántula	
<b>II. ANTECEDENTES</b>	<b>23</b>
<b>III. HIPOTESIS</b>	<b>26</b>
<b>IV. OBJETIVO GENERAL</b>	<b>26</b>
<b>IV.OBJETIVOS PARTICULARES</b>	<b>26</b>
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>27</b>
V.1 Material vegetal	
V.2 Esterilización de la semilla	
V.3 Siembra de plantas	
V.4 Extracción de proteína	
V.5 Determinación fluorométrica de la actividad de GUS	

<b>VI. RESULTADOS</b>	<b>29</b>
VI.1 Análisis del efecto de mutantes insensibles a ABA sobre los patrones de expresión del gen reportero GUS en presencia o no de la región 3´-no traducida (3´-NT) del gen PVLEA-18 durante la etapa de establecimiento de la plántula.	
VI.2 Análisis del Efecto de mutantes insensibles a ABA sobre los patrones de expresión del gen reportero GUS en presencia o no de la región 3´-no traducida del gen PvLEA-18 en la semilla seca.	
<b>VII. DISCUSIÓN</b>	<b>36</b>
<b>VIII. CONCLUSIONES</b>	<b>44</b>
<b>IX. PERSPECTIVAS</b>	<b>45</b>
<b>IX. REFERENCIAS</b>	<b>46</b>

## RESUMEN

Las plantas constantemente están expuestas a múltiples estreses ambientales los cuales pueden ser de origen biótico o abiótico. El déficit hídrico es uno de los tipos de estrés abiótico más comunes que las plantas enfrentan durante su ciclo de vida y que influye directamente sobre su desarrollo, crecimiento y productividad (Bray, *et al* 1997). Uno de los mediadores de la respuesta a condiciones de estrés abiótico y, en particular la respuesta al déficit hídrico, es la fitohormona ácido abscísico (ABA). El ABA además de participar en la respuesta de las plantas a la limitación de agua, juega papeles importantes en muchos procesos celulares incluyendo el desarrollo de la semilla (embriogénesis), la dormancia, la germinación y el crecimiento vegetativo (Xiong *et al.*, 2003). También se le ha implicado como un regulador positivo de la expresión de proteínas que se acumulan en la semilla seca, las cuales se ha propuesto que participan en la tolerancia a la desecación. Al mismo tiempo que se elevan los niveles de ABA en los embriones en estadios medios y avanzados se acumulan ciertos RNAs mensajeros, entre los que se encuentran aquéllos que codifican para estas proteínas a las que se les ha llamado proteínas LEA (del inglés Late Embryogenesis Abundant) por ser abundantes durante la embriogénesis tardía (Baker *et al.*, 1988; Dure *et al.*, 1989).

En el laboratorio se caracterizó el gen *PvLEA-18*, como un nuevo gen de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Se encontró que tanto su transcrito como su proteína se expresan en semilla, y se acumulan en plántulas de frijol etioladas, no sólo en respuesta a déficit hídrico, sino durante condiciones de irrigación óptima en tejidos vegetativos en crecimiento, en respuesta a ABA exógeno y a condiciones de deshidratación (Colmenero-Flores *et al.*, 1997). En nuestro laboratorio también demostramos que la respuesta a deshidratación de este gen depende parcialmente del ABA y, que otra parte de su respuesta es independiente de ABA. Adicionalmente se demostró que esta respuesta a la limitación de agua que se da de manera independiente de ABA se regula a nivel traduccional a través de su región 3'-no traducida (Moreno y Covarrubias, 2001; Battaglia y Covarrubias, 2008). Puesto que la respuesta de este gen a la escasez de agua durante el crecimiento vegetativo es mayoritariamente independiente de ABA y, dado que por otro lado, este gen es capaz de responder eficientemente a los tratamientos con ABA, surgió la hipótesis de que su capacidad de responder al ABA se debía a que la regulación por ABA ocurre principalmente durante el desarrollo de la semilla y/o en las etapas tempranas del establecimiento de la plántula. Con la finalidad de identificar aquellos reguladores que participan en este proceso regulatorio a través

de ABA, se caracterizó la expresión de este gen en ausencia de dos de los reguladores que participan en la regulación de la expresión genética mediada por ABA en la semilla y en la fase de establecimiento de plántula como son los factores transcripcionales *ABI3* y *ABI5*. Adicionalmente también decidimos analizar la participación de otro de los reguladores de la respuesta al ABA como lo es *ABI1*, una fosfatasa que se ha involucrado principalmente en la respuesta al ABA durante el crecimiento vegetativo. Las plantas mutantes en estos tres genes, *abi1*, *abi3* y *abi5*, se consideran insensibles al ABA; es decir, son incapaces de responder a la presencia del ABA.

Los datos obtenidos en este trabajo indican que los productos de los genes *ABI3* y *ABI5* actúan como reguladores positivos, en tanto que el gen *ABI1* ejerce una regulación negativa durante la etapa de establecimiento de la plántula, en la que se ha especulado que los niveles de ABA se incrementan. En la semilla seca mis resultados sugieren que *ABI5* regula positivamente la expresión del gen *PvLEA-18* al igual que lo que sucede con otros genes *LEA*. El factor transcripcional *ABI3*, contrario a lo reportado hasta ahora como regulador positivo de algunos genes *LEA* durante el desarrollo de la semilla, no parece participar en la regulación de la expresión del gen *PvLEA-18*. Por otro lado, sorpresivamente se encontró que el producto del gen *ABI1* actúa como regulador positivo de la expresión del gen *PvLEA-18* durante el desarrollo de la semilla. Estos resultados contrastan con los antecedentes de que *ABI1* es un regulador negativo en la vía de señalización mediada por ABA en tejido vegetativo, por lo que una posibilidad que surge de estos datos es que en semilla seca *ABI1* regula negativamente algún regulador positivo que interacciona de manera directa con el promotor del gen *PvLEA-18*.

Además de lo anterior, en este trabajo se demuestra que la región 3'-NT también ejerce un efecto estimulante sobre la expresión de la proteína *PvLEA-18* durante el desarrollo de la semilla y durante la etapa de establecimiento de la plántula, lo que sugiere que la regulación traduccional sobre el transcrito de este gen también ocurre durante el desarrollo bajo condiciones óptimas de crecimiento.

## I.- INTRODUCCION

---

El estrés puede ser 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 CO<sub>2</sub> o la captación de minerales (Taiz y Zeiger, 1991). Las plantas constantemente están expuestas a múltiples estreses ambientales los cuales pueden ser de origen biótico o abiótico. El estrés biótico se debe a la influencia de otros organismos sobre la planta mientras el estrés abiótico surge de un exceso o un déficit en las condiciones físicas o químicas del ambiente. El estrés desencadena una variedad de respuestas en la planta, que se observan como cambios en la tasa de crecimiento y productividad, hasta alteraciones en la expresión genética y en el metabolismo (Bray et al., 2000). Entre los estreses de tipo abiótico están: la sequía, la salinidad, el frío, la limitación de nutrientes, así como también las variaciones en la temperatura y el pH.

El déficit hídrico es uno de los tipos de estrés abiótico más comunes al que las plantas se enfrentan durante su ciclo de vida y que influye directamente sobre su desarrollo, crecimiento y productividad. Este se presenta cuando el aporte de agua desde el suelo es menor que la tasa de transpiración (Bray, 1997). Desde el punto de vista agronómico es una de las causas de mayor pérdida de productividad de un cultivo.

Las plantas responden al déficit hídrico a distintos niveles: morfológico, fisiológico, celular, molecular y metabólico, lo que les permite adaptarse o tolerar las condiciones de estrés; de modo que las plantas que son capaces de adquirir más agua o que hacen un uso más eficiente de ésta podrán tener resistencia al estrés por sequía (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Las respuestas dependen de la duración y la severidad del estrés, del genotipo de la planta, del estado de desarrollo, del órgano y del tipo celular en cuestión (Singh, 2002).

Una de las respuestas que preceden a estas modificaciones es la inducción de un grupo de genes que codifica proteínas implicadas en estos procesos adaptativos (Ingram et al., 1996). La caracterización de la respuesta al déficit hídrico a nivel bioquímico, celular y molecular ha generado información valiosa para entender las estrategias que las plantas utilizan para contender con este tipo de estrés ambiental. Este análisis ha permitido la identificación de diferentes proteínas que se sintetizan de *novo* o que incrementan sus niveles, y cuya función se ha relacionado al proceso adaptativo. Aunque los cambios en el metabolismo y en el desarrollo inducidos por estrés se pueden

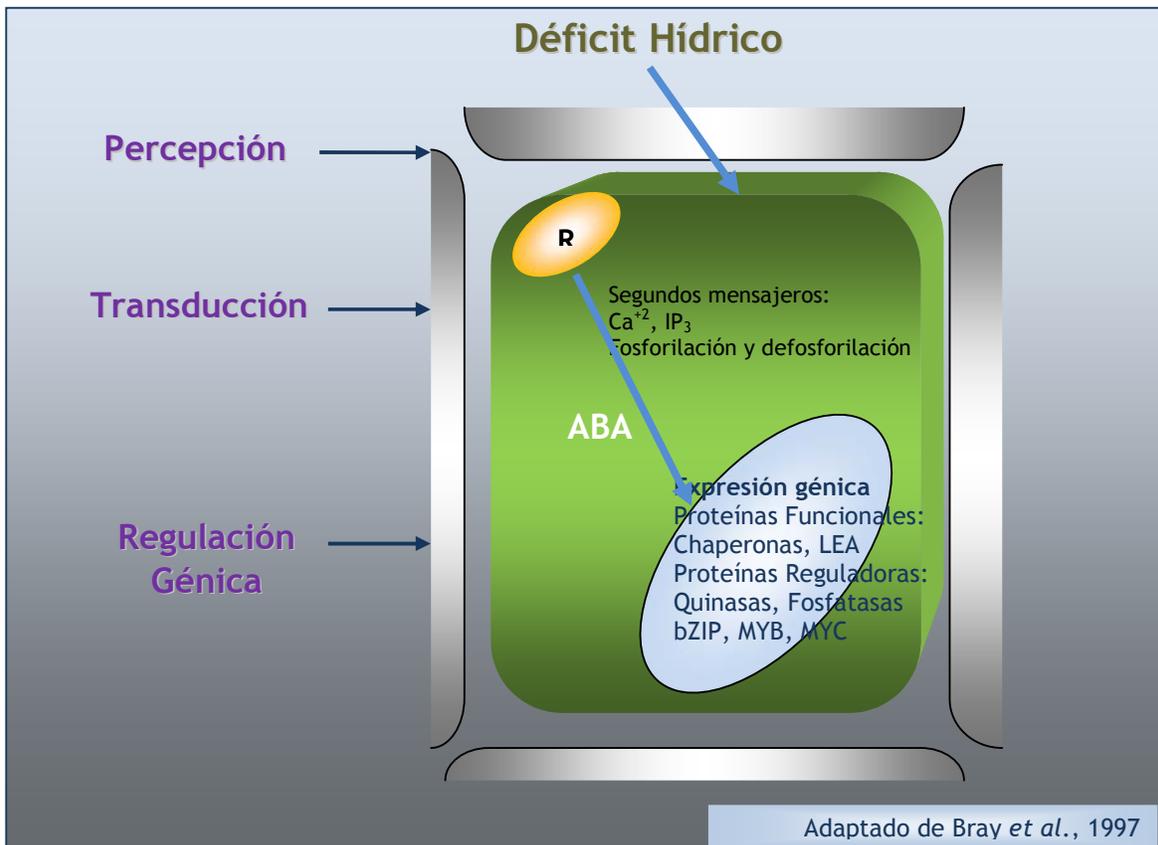
atribuir, en buena parte, a una alteración de la expresión genética en la que algunos genes se reprimen mientras otros se inducen, también se han involucrado cambios derivados de alteraciones a nivel post-transcripcional en las que se modifica la estabilidad de un transcrito, o su traducibilidad; o bien, modificaciones que afectan la actividad de diferentes enzimas o la afinidad de ciertos ligandos.

## **1. REGULACION DE LA EXPRESION GENETICA EN RESPUESTA A DEFICIT HIDRICO.**

### **1.1 Percepción del estrés.**

La respuesta al estrés inicia con la percepción del mismo a nivel celular, la cual activa una o varias vías de transducción de señales que, a su vez, transmiten la información dentro de una célula y, posteriormente, a toda la planta.

El primer paso en la percepción del déficit hídrico es el reconocimiento de la señal de estrés, esto desencadena la transducción y amplificación de la señal, para que finalmente se activen o repriman diferentes mecanismos de regulación, así como un conjunto de genes implicados en la respuesta al mismo. Cualquiera de estas fases, y otras intermedias, pueden estar sujetas a regulación, de tal forma que dependiendo del grado de estrés, de la etapa de desarrollo de la planta, del tipo celular en el que se perciba, etc., se podrá modular el tipo, la duración o la intensidad de la respuesta. Es posible imaginar que existen varios estímulos 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 intracelular de solutos y las alteraciones en las conexiones entre la membrana plasmática y la pared celular o en las interacciones proteína-ligando; sin embargo, a la fecha se desconoce el (o los) mecanismo(s) por el cual la célula vegetal percibe los cambios en la disponibilidad de agua (Bray, 1997) (Figura a).



**Figura a.** Respuesta de la célula frente a una situación de déficit hídrico. A la derecha se indican las diferentes etapas de la respuesta. El sensor de cambio osmótico está representado con R y el núcleo de la célula con una elipse azul.

Los diferentes tipos de estrés provocan diferentes estímulos con atributos específicos, aunado a ello existen elementos que se comparten entre ellos y que pueden representar nodos o puntos de interacción entre diferentes vías de señalización, lo que llevaría a pensar que existen múltiples sensores primarios encargados en diferenciar la señal de estrés. Una de las primeras respuestas al estrés producido por las bajas temperaturas, la sequía y las altas concentraciones de sales es la inducción de flujos transitorios de Ca<sup>2+</sup> hacia el citoplasma, ya sea por su influjo del espacio apoplástico o por su liberación desde un almacén interno, por lo que los canales responsables para este flujo pueden representar un tipo de sensor para estas señales de estrés.

### 1.2 Transducción de la señal del ABA.

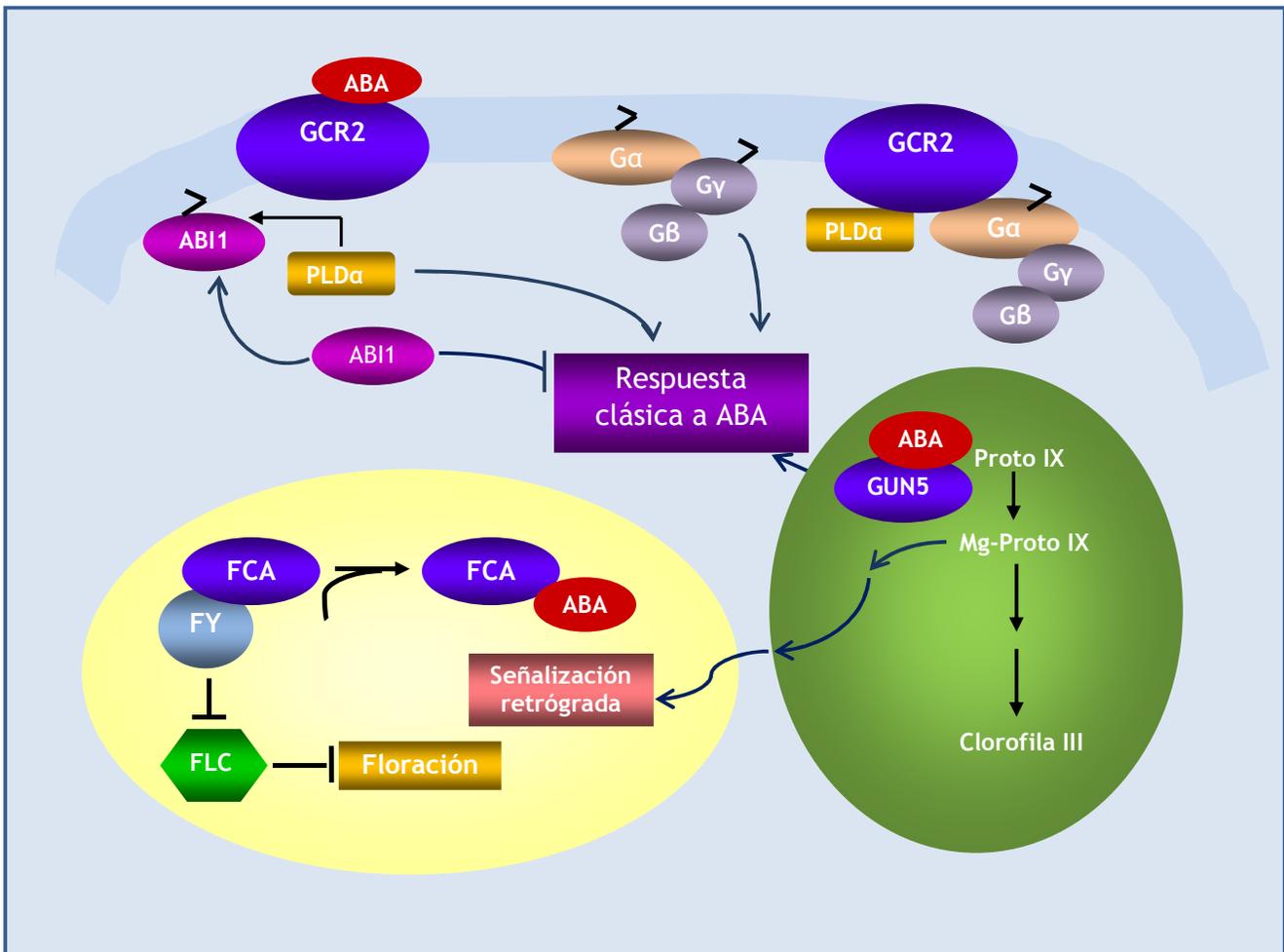
Uno de los mediadores de la respuesta a condiciones de estrés abiótico, en particular, en respuesta al déficit hídrico, es la fitohormona ácido abscísico (ABA). Sus niveles en la planta están relacionados con las condiciones de estrés a la que ésta se exponga. Como en el caso de otras hormonas vegetales, la detección del ABA por la célula

vegetal requiere de un mecanismo de reconocimiento; es decir, requiere de uno o varios receptores, a partir de los cuales la señal se transduce hacia los diferentes procesos, generando así una respuesta. La vía de transducción de señales a través de la cual ABA actúa en el proceso de respuesta a estrés por déficit hídrico incluye proteínas cinasas/fosfatasa que a su vez responden a las señales del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Bray, 1997). Existen diversos datos que indican que ABA genera múltiples alteraciones, tales como cambios en el pH interno y despolarización de la membrana plasmática, regulando de esta manera diferentes tipos de canales iónicos. El ABA activa canales tipo-S y canales rectificadores de la entrada de  $\text{K}^+$ , e inhibe canales rectificadores de la salida de  $\text{K}^+$  (Leung y Giraudat, 1998).

Por medio de análisis genéticos se han caracterizado algunos componentes de la vía de señalización de ABA y, aunque se han identificado algunos receptores para esta hormona (Razem, *et al.*, 2006; Shen *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2007), se desconoce cuál es el receptor de esta fitohormona para un estímulo determinado, o si cada uno de estos receptores se encuentra en tipos celulares particulares. Otra vía que se ha utilizado para el análisis de proteínas de unión a ABA es el uso de ensayos o análisis bioquímicos, lo que ha permitido aislar algunos receptores putativos de ABA.

Aunque algunos estudios indican que los genes que responden a ABA codifican para proteínas de unión a RNA o para proteínas que participan en el procesamiento de RNA, no se ha demostrado que alguna de estas proteínas sea funcional en la unión a ABA bajo condiciones de estrés. En reportes recientes demostraron que la proteína nuclear FCA, la cual es capaz de unirse a RNA y está involucrada en la regulación de los tiempos de floración, se une con una alta afinidad a ABA, en una interacción estereoespecífica. La interacción entre FCA y ABA tiene efectos moleculares en eventos hacia abajo en la vía implicada en la regulación del proceso de floración, conocida como vía autónoma, y por consiguiente incide en el desarrollo de la planta durante la transición hacia la floración (Razem *et al.*, 2006). Por otra parte, estrategias bioquímicas han permitido la identificación de proteínas de unión que se consideran como receptores putativos de ABA. Ahora se sabe que las proteínas de unión específicas a ABA, caracterizadas en *Vicia faba*, están involucradas en la señalización estomática inducida por ABA, y se denominan receptores putativos del ABA (ABAR). Uno de estos genes codifica para la subunidad H de la quelatasa de magnesio (*GUN5*) que es un componente clave para la biosíntesis de clorofila y la señalización retrógrada entre el núcleo y los plástidos bajo condiciones de estrés. En *Arabidopsis*, *GUN5* se une específicamente a ABA y media la señalización como un regulador positivo en la germinación de la semilla, el crecimiento

post-germinación y el movimiento estomático. Se sabe también que *GUN5* es una proteína ubicua expresada en todos los tejidos, lo que sugiere que es capaz de percibir la señal de ABA en toda la planta (Shen *et al.*, 2006). En estudios más recientes se ha sugerido que la percepción del ABA extracelular es importante, lo que ha llevado a pensar que existen receptores localizados en la membrana plasmática, como es el caso de los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), que constituyen un mecanismo para la percepción de señales externas conservado en organismos eucariotes; por ejemplo, en animales se ha visto que la vía de señalización mediada por GPCR juega un papel vital en los procesos de la visión, el gusto y el olfato. En plantas (*A. thaliana*) las GPCRs tienen una sub-unidad G $\alpha$  (GPA1), una sub-unidad G $\beta$ , y dos sub-unidades  $\gamma$  canónicas. Ahora se sabe que el receptor de ABA acoplado a la proteína G interactúa genética y físicamente con la sub-unidad GPA1 y de esta manera media las respuestas a ABA en *Arabidopsis*. La sobre-expresión de este receptor da un fenotipo de hipersensibilidad a ABA. Este receptor se une a ABA con alta afinidad en concentraciones fisiológicas, con la cinética y estereo-especificidad esperadas (Liu , 2007) (Figura b). A pesar de estos avances, a la fecha aún no se han identificado los receptores de ABA que participan en el desarrollo de la semilla y el crecimiento de la plántula en condiciones de estrés hídrico.



**Figura b. Receptores de ABA.** Hasta la fecha se han identificado tres receptores de ABA en *Arabidopsis thaliana*. La proteína de unión a RNA o FCA (Flowering Time Control A), es importante en el control de la transición del estado vegetativo al estado floral. En tiempo de floración esta proteína se une a otra proteína de unión a RNA llamada FY (Flowering locus Y) y en presencia de ABA este complejo regula de manera negativa al represor floral FLC (Flowering Locus C), lo que inhibe la floración. El segundo receptor es la sub-unidad H de la quelatasa de Magnesio IX (*GUN5*) que está involucrada en el primer paso de la síntesis de clorofila. Esta quelatasa también juega un papel clave en la señalización retrógrada entre el cloroplasto y el núcleo bajo condiciones de estrés. Y por último el tercer receptor GCR2 está acomodado a proteínas G y cuando se une a ABA este libera el complejo trimérico de proteínas G ( $G\alpha$ , GB y  $G\gamma$ ) que actúan como reguladores en la apertura de las células guarda y en la dormancia de la semilla (McCourt y Creelman, 2008).

- **Respuesta dependiente de ABA**

Los genes inducidos durante estrés a través de ABA pueden dividirse en dos grupos. Están los que se inducen por la intermediación de ABA y cuya expresión es independiente de la síntesis de proteínas; es decir, donde no se requiere síntesis de proteínas de *novo* para su inducción. De otro lado, están los genes inducidos por ABA de un manera dependiente de la síntesis de proteínas de *novo*. Además de los genes inducidos por ABA, existe un grupo de genes cuya expresión en respuesta a la limitación de agua no depende de la participación de ABA y cuyos mediadores a la fecha no se han

definido con precisión. En este grupo se pueden distinguir algunos sub-grupos de acuerdo a los factores transcripcionales involucrados, lo cual sugiere la existencia de diferentes vías de transducción mediadas por diferentes moléculas (Figura c) (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996).

El análisis computacional de los promotores de diferentes genes que responden a ABA ha permitido la identificación de varios elementos en *cis* involucrados en la regulación de su expresión (Busk y Páges, 1998; Leung y Giraudat, 1998). Tal es el caso de los genes *Em* de trigo y *Rab16* de arroz, que muestran un elemento conocido como ABRE (por ABscisic acid Response Element) que, en algunos casos, se ha reportado como necesario para la transcripción dependiente de ABA (Guiltinan *et al.*, 1990). Este elemento es definido como una secuencia de 8-10 pb en la que la secuencia ACGT, o caja G, forma el centro o núcleo de la misma. Ahora se reconoce que las secuencias que flanquean al núcleo ACGT, así como al mismo elemento ABRE, son importantes para el funcionamiento *in vivo* de este elemento. Dado que el elemento ABRE no es el único que tiene el núcleo ACGT, éste se define por su función, ya que las secuencias que lo flanquean, no muestran consenso (Busk y Páges, 1998). A la fecha se han identificado y aislado varios factores de transcripción con dominios básicos, tipo cremallera de leucina (bZip), que se unen a este elemento. Entre este tipo de factores transcripcionales se encuentran los bZip, específicos de embrión (ABI5), cuya unión al ABRE ha sido demostrada *in vivo*. La evidencia acumulada hasta ahora indica que la regulación de los genes controlados por ABA a través del ABRE es independiente de la síntesis de proteínas, lo cual es indicativo de que los factores que los activan están presentes en la célula en cantidades suficientes antes de la situación de estrés. Otros elementos reguladores en *cis* identificados en los promotores de genes regulados por las vías dependientes de ABA son aquéllos a los que se unen los factores transcripcionales tipo MYB y MYC. Cabe mencionar que la expresión de los genes para estos factores transcripcionales requiere de la señal del estrés mediada por ABA por lo que se consideran dentro del grupo que depende de la síntesis *de novo* de proteínas.

- **Respuesta independiente de ABA**

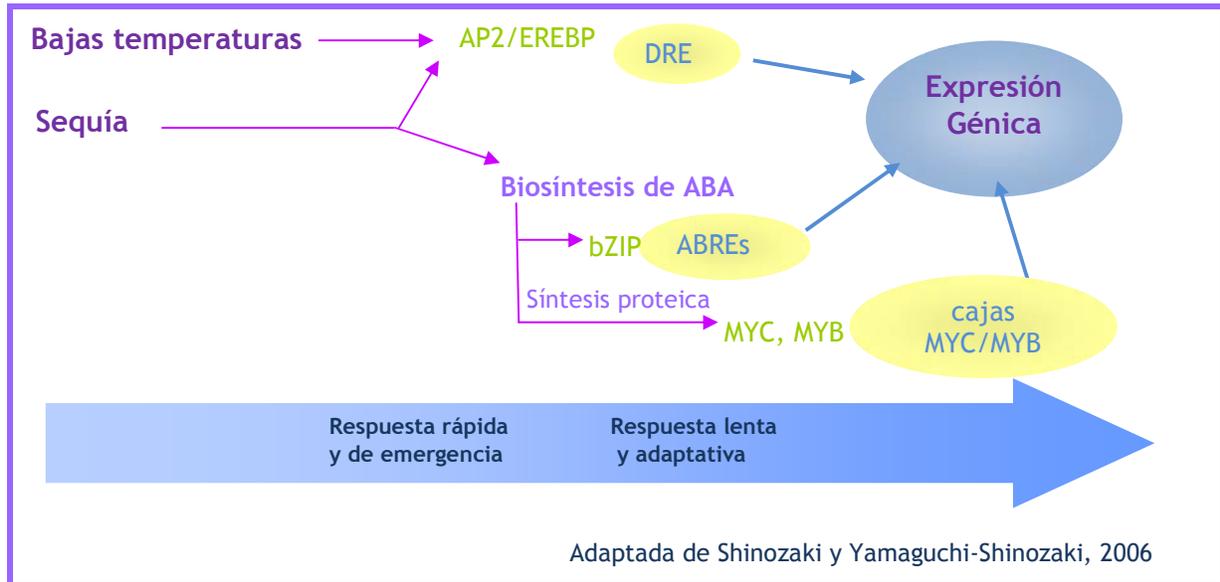
En relación al análisis de los promotores de los genes modulados por las vías independientes de ABA, éste ha llevado a describir diferentes elementos reguladores en

*cis*, como es el caso del elemento DRE (del inglés Drought Response Element), al cual se unen factores transcripcionales tipo AP2, conocidos como factores o proteínas DREB, cuya expresión también se ha encontrado que depende de la síntesis de proteínas. Tal es el caso del promotor del gen *rd29A* de *A. thaliana* (Yamaguchi-Shimozaki, 1994) en donde se identificó por primera vez este nuevo elemento en *cis* de respuesta a deshidratación. Este elemento DRE es necesario para la inducción por déficit hídrico del gen *rd29A*, aún en ausencia de niveles elevados de ABA. La misma secuencia ha sido encontrada en promotores de otros genes, algunos de los cuales también responden a ABA a través de otros elementos (Busk *et al.*, 1997). Consistente con su participación en procesos en respuesta a fenómenos similares, es común encontrar que alguno de estos elementos, independientes y/o dependientes de ABA, están presentes en genes que responden a diferentes condiciones ambientales que producen déficit hídrico como son las bajas temperaturas o las altas concentraciones de sales (Iwasaki *et al.*, 1997).

La existencia de vías dependientes e independientes de ABA fue sugerida tiempo atrás cuando se describió que aunque la expresión de muchos genes que se inducen durante estrés hídrico se incrementa considerablemente por aplicaciones de ABA, no hay una correlación consistente entre los niveles de ciertos RNAs mensajeros y los niveles de ABA bajo estas condiciones. Estas evidencias sugirieron entonces que la expresión de algunos genes durante deshidratación es total o parcialmente independiente de ABA (Chandler y Robertson *et al.*, 1994). Por tanto, se propuso la presencia de factores adicionales involucrados en la modulación de algunos genes durante estrés. Ahora sabemos que, de hecho, esto ocurre y que estos factores, presentes en las plantas estresadas, podrían actuar conjuntamente con los factores inducidos por ABA, o incluso depender uno del otro, para generar un efecto sinérgico.

El hecho de que la expresión de un gen determinado sea inducido por ABA, no prueba que la respuesta de este gen a deshidratación sea dependiente de ABA. El análisis de la expresión de diferentes genes por tratamientos con ABA generó cierta confusión en la literatura, ya que para los autores que reportaban este tipo de experimentos con genes que respondían al déficit hídrico concluían erróneamente que la respuesta de estos genes al estrés estaba mediada por ABA. A la fecha sabemos que en muchos casos, ésto era incorrecto; ya que en efecto los genes podrían estar modulados por ABA pero no necesariamente en respuesta a la limitación de agua sino en algún otro proceso; de hecho su expresión durante deshidratación resultó ser independiente de ABA. Todo ésto indica que la habilidad de un gen para responder a ABA bajo condiciones óptimas de crecimiento, no implica que su respuesta al estrés este regulada a través de ABA.

Con base en diferentes datos se ha planteado la existencia de al menos tres vías de regulación genética en respuesta a déficit hídrico, dos dependientes de ABA (una dependiente de la síntesis de proteínas y la otra independiente de la síntesis de proteínas) y dos independientes de ABA, a través del elemento tipo DRE/CTR (Figura c) (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 2006).



**Figura c. Respuestas moleculares ante una situación de estrés causado por sequía y bajas temperaturas.** La flecha azul indica el transcurso del tiempo, en verde se indican los factores transcripcionales involucrados en cada vía y en azul los elementos *cis* que regulan la expresión génica. Las referencias se encuentran en el texto.

### 1.3 Regulación transcripcional en respuesta al estrés

Muchos genes de plantas son regulados en respuesta a estreses abióticos, tales como deshidratación y frío, y sus productos génicos funcionan en respuesta al estímulo. En las vías de transducción de señales que van desde la percepción del estímulo estresante hasta la expresión génica, varios factores transcripcionales (FTs) y elementos que actúan en *cis* funcionan no sólo como interruptores moleculares sino también como puntos terminales en los procesos de señalización. El tiempo de expresión de los genes en respuesta al estrés es regulado por una combinación de FTs y elementos que actúan en *cis*, los cuales se encuentran dentro de los promotores de genes de respuesta a estrés (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 2006).

Los elementos DRE/CRT y ABRE actúan en *cis* y se encuentran en los promotores de genes inducidos por estrés. En general, los elementos DRE/CRT y sus FTs correspondientes funcionan en la fase temprana de la expresión génica en respuesta a

estrés inducido por salinidad, deshidratación y principalmente por frío; por otra parte, los elementos ABRE y sus FTs funcionan después de la acumulación de ABA y están involucrados principalmente en los procesos tardíos y de adaptación al estrés. El elemento DRE en algunas ocasiones funciona como uno de los elementos acopladores de los elementos ABRE. Este acoplamiento parece estar dado por las proteínas que reconocen estos elementos, lo que resulta en una interacción a nivel de promotor entre las vías dependiente e independiente de ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 2006).

El estrés abiótico afecta tanto el crecimiento como el desarrollo de las plantas (por ejemplo, el tiempo de floración y el crecimiento celular), ésto indica que existe una interacción entre las señales de estrés ambiental y el crecimiento de la planta. Las hormonas de la planta están involucradas en dicha interacción. La transcripción es importante en la regulación del desarrollo de la planta y las interacciones ambientales; este proceso, puede verse afectado por interacciones entre las redes regulatorias de otras vías. Tanto la regulación positiva como la negativa son importantes para la expresión génica, y tanto la participación de represores como la degradación de factores transcripcionales que actúan como activadores juegan un papel importante en la regulación negativa de la expresión génica (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki *et al.*, 2006).

A través de micro-arreglos se ha realizado el análisis del transcriptoma correspondiente al conjunto de células de diferentes órganos de una planta en respuesta a sequía, lo que ha permitido identificar docenas de factores transcripcionales involucrados en la respuesta de la planta a esta situación de estrés. Muchos de estos FTs se encuentran dentro de grandes familias, tales como AP2/ERF, bZIP, NAC, MYB, MYC, del tipo dedos de zinc (Cys2His2) y WRKY (Umezawa y Shinozaki *et al.*, 2006).

La expresión de los FTs a su vez regula la expresión de genes blanco, los cuales están involucrados en la respuesta y/o tolerancia a sequía. Los activadores transcripcionales que regulan la respuesta de genes de estrés han sido utilizados para producir plantas transgénicas tolerantes a sequía. Por ejemplo, la sobre-expresión del FT DREB1/CBF3 (por Dehydration-Responsive Element Binding protein/CRT Binding Factor) en *Arabidopsis*, además de aumentar la expresión de muchos genes blanco de respuesta a estrés, también da lugar a fenotipos de tolerancia a sequía, y a otros tipos de estrés como congelamiento y altas concentraciones de sal. En contraste, se ha reportado que la sobre-expresión de los FTs AREB1 (por ABA-Responsive Element Binding protein),

ABF2 y DREB2A no inducen de manera significativa la sobre-expresión de genes que se saben implicados en la respuesta a sequía y, que en consecuencia, no dan lugar a algún fenotipo relacionado con la tolerancia a la escasez de agua. Es por esto último se ha sugerido que los genes que se encuentran bajo el control de estos FTs podrían no estar involucrados directamente en la tolerancia a sequía, o bien que se requiere de alguna modificación post-transcripcional para inducir la expresión de los mismos (Umezawa y Shinozaki *et al.*, 2006).

Los represores transcripcionales que regulan la expresión de genes de respuesta al déficit hídrico también han sido utilizados en el estudio de tolerancia a la sequía. El represor transcripcional *AtMYB60* en *Arabidopsis* funciona en la regulación de los movimientos estomáticos. Este gen es específico de células guarda y su expresión está regulada negativamente durante estrés por sequía. Una mutación nula de *AtMYB60* da como resultado la reducción en la apertura estomática y disminuye la marchitez bajo condiciones de estrés hídrico. Algunos represores transcripcionales de plantas tipo dedos de zinc poseen dominios de represión y están involucrados en la regulación de la expresión de genes. Recientemente se demostró que el dominio de represión denominado SRDX que se deriva del motivo EAR de SUPERMAN (un tipo de represor tipo dedo de zinc (TFIIA)) es útil para determinar el papel de FTs de respuesta a estrés, los cuales regularmente tienen homólogos funcionalmente redundantes. La sobre-expresión de un represor quimérico, conformado por un FT fusionado al dominio de SRDX, suprime de manera dominante la expresión de los genes blanco de este FT, aún en presencia de FTs redundantes. Otro represor transcripcional es STZ, tipo dedo de zinc (Cys/His<sub>2</sub>), cuya expresión aumenta en condiciones de deshidratación, alta salinidad y frío, así como por tratamientos con ABA; en tanto que su sobre-expresión constitutiva incrementa la tolerancia a estrés por sequía. Además, se ha visto que plantas de *Arabidopsis* que sobre-expresan un ortólogo de STZ (CAZFP1), el cual es un represor transcripcional en levadura, también muestran tolerancia al estrés por sequía y presentan resistencia a infecciones bacterianas (Umezawa y Shinozaki *et al.*, 2006).

#### **1.4 Participación del ABA en la regulación de la respuesta a estrés y a desarrollo.**

Muchos de los genes que se expresan durante la sequía en los tejidos vegetativos, también se expresan durante la desecación de la semilla. También se sabe que el ABA se acumula en tejidos vegetativos en respuesta a la sequía, por tanto, el ABA puede tener una función durante los periodos de estrés hídrico impuestos por las condiciones

ambientales o por el desarrollo natural. Aún cuando estos datos sugerían la participación de ABA como mediador de la respuesta al déficit hídrico, ahora sabemos, como se menciona anteriormente, que existen genes que se inducen en respuesta a la sequía independientemente de ABA. Todo lo anterior ha surgido como resultado del análisis de los patrones de expresión de diferentes genes en mutantes afectadas tanto en la vía de síntesis de ABA (mutantes *aba*), como aquéllas afectadas en la vía de percepción de esta hormona (mutantes *abi*), principalmente, en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*. El fenotipo de las mutantes deficientes en ABA (*aba1*, *aba2* y *aba3*) dan la mejor indicación de los procesos en los que participa esta fitohormona. Así por ejemplo, las mutantes *aba* presentan falta de dormancia de la semilla, alteración de sus relaciones hídricas y una pobre aclimatación a una variedad de estreses (Koorneef *et al.*, 1998). El producto del gene *ABA1* es la zeaxantina epoxidasa (ZEP), que cataliza la epoxidación de zeaxantina y anteroxantina a violaxantina. El producto del gen *ABA 2* cataliza la conversión de xantoxina a ABA-aldehído y, *ABA3* (*LOS5*) codifica para una sulfurilasa que genera la forma activa del cofactor molibdeno necesario para la actividad de la aldehído oxidasa que cataliza el paso final en la biosíntesis de ABA (de ABA-aldehído a ABA).

Las mutantes insensibles a ABA o mutantes *abi* (*abi1*, *abi2*, *abi3*, *abi4*, *abi5*, *abi8*) son incapaces de percibir ABA. Estas mutantes muestran una germinación insensible a ABA, pero difieren en sus efectos en otras respuestas reguladas por esta hormona (Finkelstein *et al.*, 2002).

Los genes *ABI1* y *ABI2* codifican para proteínas homólogas que pertenecen a la clase 2C de serina-treonina fosfatasa (PP2Cs; Leung *et al.*, 1994, 1997; Meyer *et al.*, 1994; Bertauche *et al.*, 1996; Leube *et al.*, 1998; Rodríguez *et al.*, 1998a), y actúan como reguladores negativos en la señalización de ABA. El papel de las enzimas PP2C en la señalización por ABA fue sugerido por la caracterización de las mutantes *abi1-1* y *abi2-1* en *Arabidopsis* obtenidas de una población de semillas mutagenizadas mediante etilmetano-sulfonato (EMS) y que fueron capaces de germinar en concentraciones de ABA en las que las semillas silvestres no lo eran (Koorneef *et al.*, 1984). Las mutantes *abi1-1* y *abi2-1* causan alteraciones fenotípicas pleiotrópicas, como son germinación y crecimiento de la plántula en presencia de ABA, disminución en la dormancia de la semilla y regulación estomática anormal, esto último da como resultado que en condiciones de baja humedad las mutantes tiendan a presentar marchitez (Allen *et al.*, 1999; Finkelstein and Somerville, 1990; Leung *et al.*, 1997). Estos alelos mutantes, *abi1-1* y *abi2-1*, dan lugar a un fenotipo dominante negativo debido a que las

mutaciones siguen produciendo proteínas pero afectadas en su función. Uno de los experimentos que se realizaron para corroborar la posible función como regulador negativo del producto de *ABI1* consistió en obtener revertantes intragénicas de la mutante *abi1*. Estas revertantes se comportan como mutantes recesivas en contraste con las mutantes *abi1-1* antes caracterizadas y su análisis fenotípico mostró que son plantas más sensibles a ABA que las plantas silvestres, es decir, presentan un fenotipo de hipersensibilidad a ABA. Son plantas más sensibles a ABA durante la germinación de la semilla y en el crecimiento de la raíz, aumenta la dormancia en sus semillas y su tolerancia a la deshidratación. Estos datos indicaron que en estas mutantes se había perdido la función de *ABI1*. Un análisis molecular de las revertantes aisladas demostró que todas estaban afectadas en las regiones conservadas correspondientes al dominio de fosfatasa de *ABI1* y que esto resultaba en una pérdida de la actividad de fosfatasa en estas proteínas mutantes. Por lo tanto, dado que la actividad de fosfatasa estaría impidiendo su función como regulador negativo se esperaría que plantas al no poder modular la sensibilidad al ABA se comportaran como hipersensibles, corroborando así que la fosfatasa *ABI1* silvestre es un regulador negativo de la respuesta a ABA (Gosti *et al.*, 1999; Merlot *et al.*, 2001). Dicha conclusión es consistente con la observación de que en la expresión constitutiva de *ABI1* en protoplastos de maíz inhibe la acción de ABA (Sheen., *et al.* 1998).

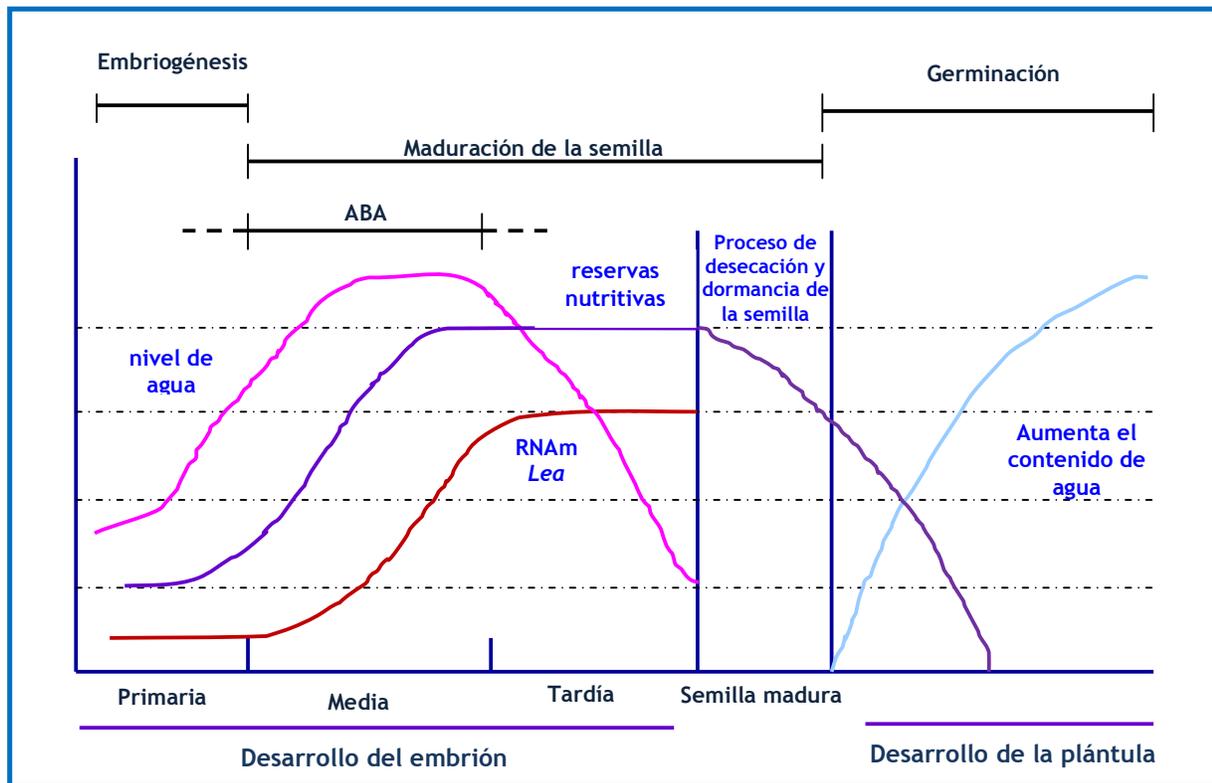
El gen *ABI3* codifica para un factor de transcripción con dominio B3 (Giraudat *et al.*, 1992) y su expresión se da principalmente en semillas y tejidos meristemáticos, además de tener bajos niveles de expresión en tejidos vegetativos (Finkelstein *et al.*, 2002). Los alelos nulos de este gen producen semillas que muestran germinación precoz, no adquieren tolerancia a la desecación, su desarrollo es incompleto y no acumulan proteínas de reserva (Azcon, *et al.*, 1993). Las plantas mutantes *abi3* se asemejan al tipo silvestre en sus relaciones hídricas.

El gen *ABI4* codifica para un factor de transcripción con dominio APETALA2 (Finkelstein *et al.*, 1998). Se ha demostrado que su expresión determina la movilización de lípidos durante la germinación de la semilla. El gen *ABI5* codifica para un factor de transcripción con dominio bZIP (Finkelstein y Lynch *et al.*, 2000). *ABI4* y *ABI5* se expresan abundantemente en semillas en desarrollo (embriogénesis tardía), su expresión durante el desarrollo del embrión es constante, no así en tejidos vegetativos en donde disminuye (Finkelstein *et al.*, 1998; Finkelstein y Lynch *et al.*, 2000).

La región bZIP de la proteína ABI5 presenta cierta homología con factores de transcripción (bZIP) caracterizados en plantas capaces de activar genes reporteros que contienen elementos de respuesta a ABA (ABREs). La proteína ABI5 se une a dichos elementos *in vitro* y, la semilla seca de mutantes *abi5* muestra disminución en los niveles de transcrito de genes de embriogénesis tardía que contienen al elemento ABRE tales como *AtEm1* y *AtEm6* (Carles y Delseny *et al.*, 2002). Estos genes pertenecen al grupo 1 de las proteínas LEA y se expresan temporal y espacialmente durante la maduración del embrión. El RNAm de *AtEM1* se expresa principalmente en tejido pre-vascular y alcanza una fuerte expresión en la punta de las raíces (Vicent *et al.*, 2000), además, su expresión inicia 2 días antes que la de *AtEM6*. Por otra parte, el mensajero de *AtEM6* se expresa esencialmente en todas las regiones del embrión, alcanzando una fuerte expresión en el meristemo apical y en el tejido pre-vascular (Vicent *et al.*, 2000). Estos dos genes codifican para proteínas similares que difieren principalmente por el número de repetidos de un motivo de 20 aminoácidos conservados (cuatro copias en *AtEM1* y una copia en *AtEM6*) (Finkelstein *et al.*, 2002).

### **1.5 Participación del ABA en la regulación de la expresión genética durante la maduración de la semilla**

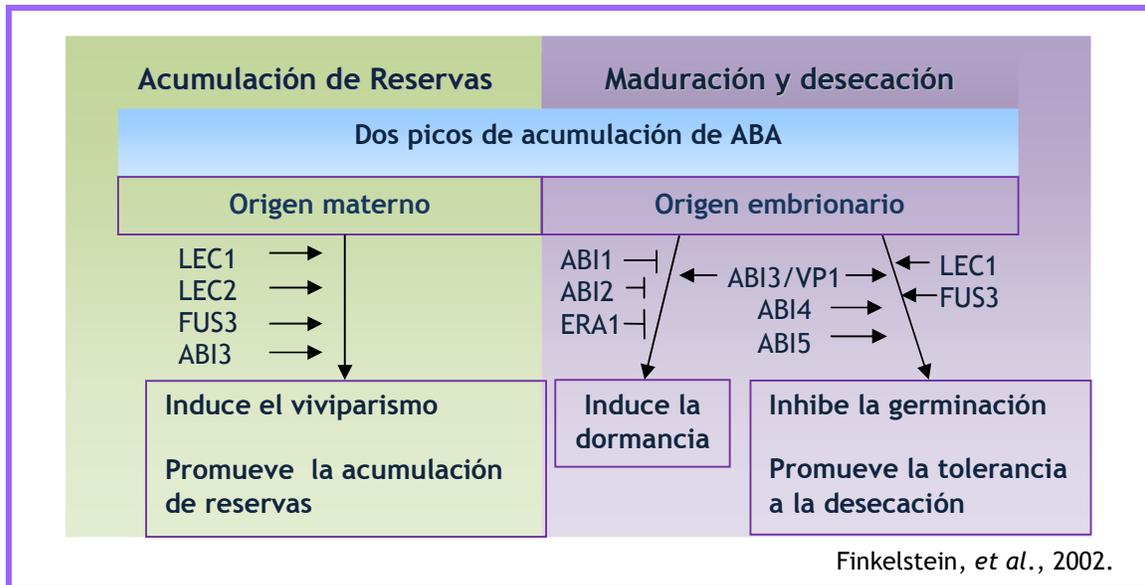
La acumulación de proteínas, incluyendo las proteínas de almacenamiento (SSP, del inglés Seed Storage Protein), y otros compuestos utilizados por la semilla como nutrientes es uno de los eventos característicos durante el desarrollo de la misma. La acumulación del material de almacenamiento ocurre durante la etapa tardía de la embriogénesis o durante la fase de maduración, aún cuando la morfogénesis no ha finalizado. El embrión también adquiere tolerancia a la desecación durante la dormancia y la fase de maduración, todo ello regulado a través de un programa genético. Las fases primaria y media están dominadas por la acción de ABA, inicialmente sintetizado en los tejidos maternos y después aunque en menor cantidad en el embrión y el endospermo (Nambara *et al.*, 2003). Durante este periodo de almacenamiento de ABA en la semilla se lleva a cabo la mayor cantidad de transcripción de proteínas de almacenamiento. Posteriormente cuando los niveles de ABA disminuyen la maduración tardía sigue y es donde se sintetizan las proteínas de embriogénesis tardía ó proteínas LEA, asociadas a los procesos de deshidratación y tolerancia a la desecación (Figura d).



**Figura d.** Diagrama que muestra los eventos que ocurren durante las diferentes etapas del desarrollo de la semilla. Los altos niveles de ABA son temporalmente correlacionados con el inicio de maduración y prevención de la germinación precoz durante la mitad del desarrollo del embrión. También se muestra el análisis del producto de los genes *lea* en la etapa de la embriogénesis tardía de la semilla, en donde los productos correlacionan con los niveles de ABA (Ross y Quatrano, 1994).

En *Arabidopsis*, los factores transcripcionales codificados por los genes *ABI3*, *ABI5*, *FUS3*, *LEC1* y *LEC2* están implicados en la regulación del programa de maduración de la semilla (Figura d) (Finkelstein *et al* 2002; Koornneef *et al.*, 1984; Meinke *et al.* 1994). *ABI3*, *FUS3* y *LEC2* pertenecen a una familia de factores de transcripción específicos de plantas que contienen un dominio de unión a DNA llamado B3 (Giraudat *et al.*, 1992; Stone *et al.*, 2001). *LEC1* codifica para una proteína que tiene homología con la subunidad HAP3 de los factores de unión CCAAT, una familia que en *Arabidopsis* está compuesta por 10 genes. Hasta ahora se ha postulado que mientras *ABI3* y *FUS3* controlan la expresión de genes durante la acumulación de proteínas de almacenamiento en la semilla, *LEC1* y *LEC2* pueden regular la maduración de la semilla, directa o indirectamente, a través de la regulación de la expresión de *ABI3* y *FUS3* (To *et al.*, 2006). Se sabe también que la proteína *LEC1* interacciona con *ABI3*, *ABI5* y *ABI4*,

favoreciendo así la respuesta a ABA. Puesto que LEC1 interacciona con los elementos de respuesta a ABA (ABRE), se ha sugerido que funciona como un co-activador junto con ABI3, aún habiendo similitudes moleculares entre las proteínas codificadas por *ABI3* y *FUS3*, las mutantes en estos genes no muestran semejanza en sus fenotipos. Las mutantes *fus3* se parecen a las mutantes *lec1* a nivel morfológico, éstas presentan rasgos de hojas en los cotiledones, así como la presencia de tricomas y la acumulación de antocianinas. Por otra parte, las semillas de mutantes *abi3* también muestran un fenotipo único, tal como la interrupción en la degradación de clorofila y la insensibilidad a ABA durante la germinación, lo que la hace diferente de las mutantes *fus3* y *lec1*. La similitud entre los fenotipos mutantes *fus3* y *lec1* sugiere que FUS3 y LEC1 regulan un grupo de genes en común.



**Figura e.** En ésta figura se muestran las vías de señalización en el desarrollo de la semilla. La referencias se encuentran en el texto.

### 1.6 Participación del ABA en la regulación durante la germinación y la etapa de establecimiento de la plántula

El período entre la dormancia de la semilla y la etapa de establecimiento de la plántula representa una fase frágil en el ciclo de vida de la planta. Durante esta transición en el desarrollo hacia el crecimiento autotrófico, las plantas pueden ser capaces de realizar un monitoreo del estatus hídrico ambiental y organizar sus respuestas adaptativas. Como el papel de ABA en la respuesta al estrés hídrico es de gran importancia, es razonable asumir que la señalización por ABA regula los procesos de rompimiento de la dormancia en la semilla y el establecimiento de la plántula (López-Molina *et al.*, 2001).

Estudios fisiológicos que consideran el efecto inhibitorio de ABA en el crecimiento de la radícula durante la germinación han permitido establecer tres estados de desarrollo (Bewley y Black, 1985). El primer estado se presenta cuando la testa externa de la semilla se rompe, el segundo estado se presenta cuando la radícula se extiende y, el tercer estado es cuando existe una disminución en la velocidad del crecimiento antes de la penetración de la radícula en las capas del endospermo y en la testa interna. Se ha demostrado que en plantas silvestres de *Arabidopsis*, la proteína ABI5 es esencial para que se dé la disminución en la velocidad del crecimiento dependiente de ABA. La acumulación de ABI5 se induce por ABA, sólo dentro de un intervalo de tiempo de alrededor de 60h posteriores a la estratificación. Los embriones germinados permanecen viables pero quiescentes durante el tiempo que ABA esté presente. Este mecanismo de control negativo sobre el crecimiento en embriones germinados representa un mecanismo adaptativo para incrementar la tasa de sobrevivencia de *Arabidopsis* bajo condiciones de déficit hídrico (López-Molina *et al.*, 2001).

Por otro lado, ABA regula la acumulación y la actividad de ABI5 durante una limitada ventana en el desarrollo de la plántula. Cuando hay una disminución en los niveles de ABA, ABI5 se degrada rápidamente por un proceso que implica la vía del proteosoma y que coincide con el inicio del crecimiento vegetativo (López-Molina *et al.*, 2001).

El ABA también se ha implicado como un regulador positivo de proteínas que se acumulan en la semilla seca y se ha propuesto que participan en la tolerancia a la desecación. Al mismo tiempo que aparecen niveles altos de ABA en los embriones en estadios medios y avanzados se acumulan ciertos RNAs mensajeros, entre los que se encuentran aquéllos que codifican para las llamadas proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) (Baker *et al.*, 1988; Dure *et al.*, 1989).

- **Proteínas de embriogénesis tardía.**

Las proteínas LEA, las cuales se han clasificado en varias familias de acuerdo a su similitud de aminoácidos, se acumulan en altos niveles durante la etapa tardía de la embriogénesis, justo antes del inicio de la desecación de la semilla. Algunas de ellas también se acumulan en tejidos vegetativos durante periodos de pérdida de agua, así como por estrés osmótico, generado por diversos agentes medioambientales (deshidratación, salinidad, frío y congelamiento) (Bray, 1993; Galau *et al.*, 1986). Los genes *LEA* fueron primero identificados y caracterizados en algodón como un grupo de

genes que codifican a transcritos que se acumulan en altos niveles en los embriones en la última etapa del desarrollo de las semillas, cuando éstas pierden más del 90% de su contenido de agua (Dure et al., 1981). Se ha propuesto que la expresión de la gran mayoría de los genes *LEA* descritos a la fecha está regulada por la fitohormona ABA durante el desarrollo de la semilla. Altos niveles en la expresión de estos genes correlaciona con altos niveles de esta hormona, tanto durante el desarrollo de la planta como durante la respuesta a estrés (Skriver et al., 1990).

Las proteínas *LEA* típicas son proteínas altamente hidrofílicas, ricas en residuos de glicina o de otros aminoácidos pequeños (ala, ser, thr) y aminoácidos cargados y, en su mayoría, carecen de cisteína y triptófano. Se predice que la gran mayoría de las proteínas *LEA* se caracterizan por no tener una estructura globular y ser, por lo tanto, resistentes a la coagulación por efecto de altas temperaturas, lo que las ha clasificado en el grupo de las proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP, del inglés intrinsically disordered proteins) (Dure III, 1993). Estas características generales las ha clasificado en un grupo más amplio de proteínas denominadas como “hidrofilinas” (Garay-Arroyo *et al.*, 2000, Battaglia et al., 2008). Las proteínas *LEA* se agrupan en 6 familias o grupos de acuerdo a la homología en su secuencia de aminoácidos (Colmenero-Flores *et al.*, 1997; Ingram y Bartels, 1996; Dure, 1993b; Battaglia *et al.*, 2008). De estos grupos, 5 pertenecen al grupo de las llamadas *LEA* típicas y uno que pertenece a las llamadas *LEA* atípicas, éstos han sido descritos en base a la similitud de la secuencia de aminoácidos y a la presencia de motivos conservados de proteínas *LEA* de diferentes especies. Las características fisicoquímicas de las proteínas *LEA* típicas permitieron la identificación de un amplio grupo de proteínas presentes en diferentes organismos llamadas hidrofilinas, en el que más del 90% de las proteínas *LEA* descritas a la fecha están incluidas. Por otra parte, se ha sugerido que su conformación flexible y su alta hidrofiliidad les proporciona una gran capacidad para interactuar con el agua y proteger proteínas y otras macromoléculas, así como otras estructuras celulares, de los efectos de la sequía. Otras posibles funciones propuestas para las proteínas *LEA* son el secuestro de iones (Dure, 1994b) y el transporte de proteínas nucleares durante periodos de estrés (Goday *et al.*, 1994).

➤ **Proteínas *LEA* del grupo I (*familia D-19*).**

Son proteínas altamente homólogas entre sí (alrededor de 65% de identidad y 80% de similitud) y de bajo peso molecular (90-110 aminoácidos). Contienen una secuencia conservada de 20 aminoácidos hidrofílicos, con un alto contenido en residuos de glicina

(16-21%), GGQTRKEQLGEEGYREMGHK. Este motivo se encuentra en tándem a lo largo de toda la proteína, lo que favorece que adopten una estructura flexible (“*random coil*”) en la mayor parte de su extensión (Espelund *et al.*, 1992). Este grupo de proteínas LEA es el más representado en la escala filogenética; ya que se han descrito proteínas similares en organismos de los tres dominios filogenéticos bacteria, archaea y eukarya.

➤ **Proteínas LEA del grupo II (*familia D-11*).**

Estas proteínas son conocidas como dehidrinas, presentan tamaños muy variados (14-150 kDa). Se caracterizan por una secuencia altamente conservada de 15 aminoácidos o segmento K, rica en residuos de lisina, con un consenso de EKKGIMDKIKEKLPG, localizado en el extremo carboxilo terminal (Campbell *et al.*, 1997, Galau y Close, 1992). El núcleo de esta región rica en lisina está repetido una o varias veces en las proteínas y se propone que podría formar hélices anfipáticas. Las proteínas LEA en este grupo también presentan un conjunto de serinas que pueden ser fosforiladas; esta región está presente en varias proteínas de este grupo pero no en todas (Close *et al.*, 1993). Algunas dehidrinas presentan como dominio conservado, el motivo (V/T) DEYGNP, también llamado “segmento Y”, el cual está localizado cerca de su extremo N-terminal (Close, 1996). Las proteínas de este grupo pueden estar localizadas en el núcleo y en el citoplasma, como se ha mostrado por experimentos de inmunolocalización y fraccionamiento subcelular. Este grupo de proteínas es el más caracterizado hasta ahora. También se ha descrito que tienen cierta capacidad de interaccionar con membranas.

➤ **Proteínas LEA del grupo III (*familia D-7*).**

Este grupo de proteínas se caracteriza principalmente por la presencia de 11-meros con la secuencia consenso de aminoácidos TAQAAKEKAGE, los cuales se repiten en tándem en un número variable de veces (entre 5 y 13). Esto hace que los miembros de esta familia tengan tamaños muy variables. Como en el caso de las dehidrinas, se propone que estos motivos constituyen  $\alpha$ -hélices anfifílicas. Las proteínas LEA del grupo III se encuentran uniformemente distribuidas en embriones de algodón en una concentración estimada de 0.34 mM, lo que supone el 4% de la proteína citosólica total (Dure, III 1993a). Esta familia es la más heterogénea ya que la secuencia consenso muestra gran variabilidad (TAQAAKEKAGE).

➤ **Proteínas LEA del grupo IV (*familia D-113*)**

Estas proteínas se caracterizan porque poseen un rango muy variable de tamaño (88-175 aminoácidos), son muy ricas en residuos de glicinas y treoninas y, a diferencia de los otros grupos de proteínas LEA, son muy ricas en alaninas (11-20%). De acuerdo con el análisis de su secuencia de aminoácidos, se predice que poseen un dominio en el extremo N-terminal conservado de unos 60-80 aminoácidos con una estructura  $\alpha$ -hélice prácticamente ininterrumpida. El resto de la proteína varía en tamaño y su secuencia está poco conservada (Dure III, 1993).

➤ **Proteínas LEA del grupo V**

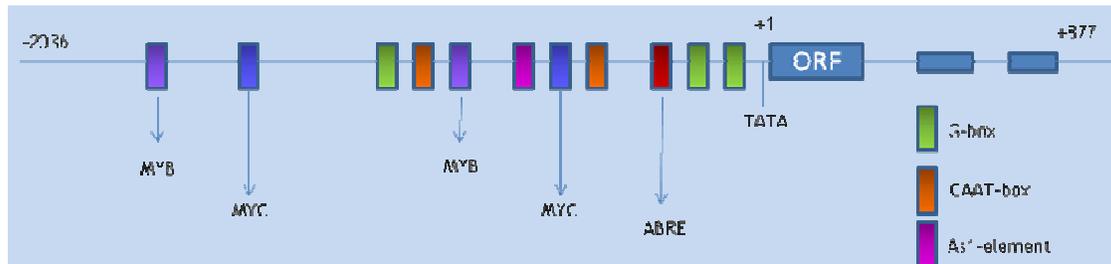
Dentro de este grupo se encuentran las denominadas LEAs atípicas que no pertenecen a ninguna de las familias antes descritas y no presentan el grado de hidrofiliidad ni la composición general de aminoácidos que caracterizan a las otras proteínas LEA (Galau *et al.*, 1993). Son proteínas de embriogénesis tardía que muy probablemente cumplen funciones diferentes a las LEA hidrofílicas o “típicas”. Su expresión en hojas maduras y sus dominios hidrofóbicos podrían estar relacionados con la protección de los tilacoides cloroplásticos durante el estrés (Galau *et al.*, 1993).

➤ **Proteínas LEA del grupo VI**

Este grupo de proteínas incluye a la proteína PvLEA-18 de frijol y proteínas de tabaco, tomate, soya, chícharo, maíz y *Arabidopsis*, las cuales fueron detectadas con un anticuerpo dirigido contra la proteínas PvLEA-18 (Colmenero-Flores *et al.*, 1999). Estas proteínas no muestran una homología significativa con las proteínas LEA de los grupos conocidos, de ahí que fueran incluidas en un nuevo grupo (Colmenero-Flores *et al.*, 1997). Se ha demostrado que *PvLEA-18* es un gen de respuesta a estrés que codifica para una proteína con una masa molecular aparente de 14-kDa que se acumula durante la embriogénesis tardía y en respuesta a déficit hídrico en tejido vegetativo. Esta proteína se caracteriza por ser altamente hidrofílica y se propone que posee una estructura flexible (“*random coil*”). Se ha sugerido que responde al estatus hídrico de la planta durante su desarrollo normal por lo que también se acumula en ciertos tejidos de plantas crecidas bajo condiciones óptimas, en donde el potencial osmótico es más bajo que en las zonas de en donde no hay crecimiento.

## II.- ANTECEDENTES

En estudios anteriores se caracterizó el gen *PvLEA-18* y se demostró que constituía un nuevo gen de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Se encontró que tanto el transcrito como la proteína del gen *PvLEA-18* se expresan en semillas durante la fase de embriogénesis tardía. Además se acumula en plántulas de frijol en crecimiento etiolado, no sólo en respuesta a déficit hídrico, sino también en tejidos en crecimiento durante condiciones de irrigación óptima y en tejidos vegetativos en respuesta a ABA exógeno y a condiciones de deshidratación (Colmenero-Flores *et al.*, 1997). Además, con el análisis de la secuencia de este gen se encontró que en su región reguladora localizada en el extremo 5' se encuentran elementos *cis* que podrían ser reconocidos por factores transcripcionales. Entre los elementos *cis* identificados a la fecha están un elemento ABRE, tres motivos ACGT o cajas G, dos sitios de reconocimiento para factores tipo MYB, dos secuencias de reconocimiento para factores tipo MYC involucrados en la respuesta a ABA y un elemento *as1* que está involucrado en la respuesta a ácido salicílico y a auxinas (Figura 1).



**Figura 1.** Localización de elementos de respuesta a ABA presentes en el promotor del gen *PvLEA-18*.

La regulación transcripcional del gen *PvLEA-18* se analizó usando plantas transgénicas de *A. thaliana* transformadas con dos genes quiméricos constituidos por la región promotora del gen *PvLEA-18* fusionada a la región codificante del gen reportero *GUS*, usando como terminador, en un caso, la región 3' no traducida del gen *NOS* (*nos-3'*) y, en el otro, la región 3' no traducida del gen *PvLEA-18* (*PvLEA-18-3'*) (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama que muestra la estructura de los dos genes quiméricos. En una de las construcciones (A) se fusionó la región promotora del gen *PvLEA-18* con la región codificante del gen  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) se utilizó como terminador la región 3' de la nopalina sintasa ( $5' - PvLEA-18/GUS/nos-3'$ ) y, en la otra construcción (B) la región 3' del gen ( $PvLEA-18/GUS/PvLEA-18-3'$ ) (Moreno y Covarrubias, 2001).

En este trabajo se demostró que la región 3' NT del gen *PvLEA-18* incrementa la actividad del gen reportero *GUS* durante el desarrollo de la planta y también en respuesta a deshidratación, siendo notablemente mayor la producida en respuesta a deshidratación, pero no así en respuesta a ABA. Tratamientos con fluridona, un inhibidor de la síntesis de ABA, sugirieron que la respuesta del gen *PvLEA-18* a condiciones de deshidratación es independiente de ABA (Moreno y Covarrubias, 2001). Todo lo anterior indicó que la respuesta del gen *PvLEA-18* a deshidratación depende parcialmente de su región 3' y, que su regulación en respuesta a sequía es mayoritariamente independiente de ABA. Con la finalidad de definir con mayor precisión la participación de ABA en la expresión del gen *PvLEA-18* en respuesta al déficit hídrico mediada por su región 3'-UTR, se realizaron cruces entre plantas con los genes quiméricos  $5' PvLEA-18/GUS-nos-3'$  ó  $5' Pvlea-18/GUS/PvLEA-18-3'$  con plantas insensibles a ABA (*abi1-1*), y se confirmó que la expresión del gen *PvLEA-18* en condiciones de deshidratación es predominantemente independiente de ABA, y que los altos niveles de expresión de este gen dependen mayoritariamente de su región 3'. Además, se determinó que la expresión del gen *Pvlea-18* durante el desarrollo de la semilla no depende de la funcionalidad de la proteína ABI1. Cabe hacer notar que en esta serie de experimentos se descubrió que en las plantas mutantes *abi1*, insensibles a ABA, el gen quimérico  $5' PvLEA-18/GUS/Pvlea-18-3'$  se expresa en niveles similares tanto en condiciones control, como en condiciones de deshidratación sugiriendo que la proteína ABI1 actúa como un regulador negativo de la expresión del gen *PvLEA-18*

durante el desarrollo normal de la planta, al menos en la etapa (plántulas 4 semanas de crecimiento) y bajo las condiciones analizadas.

Resultados en el laboratorio obtenidos por Marina Battaglia demostraron que el efecto regulatorio de la región 3'-no traducida del gen *PvLE-18* se ejerce a nivel traduccional (Battaglia M., tesis doctoral), lo que indica que la región 3'-NT de este gen favorece la traducción de su transcrito en condiciones en que la traducción global disminuye, como lo es una condición de estrés. Esto garantiza que proteínas necesarias para la célula ante una condición determinada sean producidas aún en condiciones desfavorables.

Con la finalidad de definir con mayor claridad la participación del ABA en la regulación de la expresión genética del gen *PvLEA-18* nos planteamos la siguiente hipótesis:

### III.- HIPOTESIS

---

El ABA regula la expresión del gen *PvLEA-18* durante el desarrollo de la semilla y en la etapa de establecimiento de la plántula, independiente de la región 3'-no traducida y a través de los factores transcripcionales ABI3 y ABI5.

### IV.- OBJETIVOS

---

#### 1. Objetivo General

Identificar los factores que participan en la regulación de la expresión del gen *PvLEA18* que es mediada por ABA.

#### 2. Objetivos Particulares

- ♦ Determinar la expresión de GUS en extractos de semilla seca de plantas mutantes *abi3* y *abi5*, que contienen las construcciones 5' *PvLEA-18/GUS-nos-3'* ó 5' *PvLEA-18/GUS/Pvlea-18-3'*.
- ♦ Determinar la expresión de GUS en la etapa de establecimiento de la plántula en plantas mutantes *abi3*, *abi5* y *abi1*, que contienen las construcciones 5' *PvLEA-18/GUS-nos-3'* ó 5' *PvLEA-18/GUS/Pvlea-18-3'*.

## V.- MATERIALES Y METODOS

---

### 1. Material vegetal.

Con la finalidad de monitorear la expresión del gen reportero en presencia o no de su región 3'-no traducida, se usaron semillas de plantas transgénicas de *A. thaliana* transformadas con las construcciones 5'-PvLEA18/GUS/PvLEA-18-3' ó 5'-PvLEA18/GUS/nos-3' (Moreno y Covarrubias, 2001), así como semillas de plantas insensibles a ABA de las mutantes *abi-1* que se encuentran en el fondo genético Landsberg *erecta* y, *abi3-1* y *abi-5* que se encuentran en el fondo genético Columbia, transformadas con las construcciones arriba mencionadas.

### 2. Esterilización de la semilla.

Una vez colectada la semilla seca, ésta fue hidratada en 1 ml de agua destilada estéril por 1 hora a 4°C. Posteriormente, se centrifugaron los tubos aproximadamente 20 segundos, se retiró el agua y se desinfectaron con etanol absoluto (100%) durante 3 minutos. Nuevamente se centrifugaron los tubos durante 20 segundos para decantar el etanol. Se agregó una solución de cloro 40% + tritón X-100 al 0.02% durante 7 minutos y se centrifugaron por 20 segundos para decantar esta solución, se enjuagaron las semillas cinco veces con agua destilada estéril, cada lavado se hizo de 2 a 3 minutos, en el último lavado la semilla se guardó con 500 µl de agua a 4°C por toda la noche antes de ser sembrada. El volumen de cada solución y de agua varió dependiendo de la cantidad de semilla que se vaya a esterilizar.

### 3. Siembra de plantas.

Las semillas utilizadas fueron germinadas en un medio de crecimiento (GM) que contiene sales MS 4.3 g/L (Murashige-Skoog,1962), vitamina B<sub>5</sub> 1ml/L, sacarosa 10 g/L (1%), MES 0.5 g/L, bacto-agar 6.5 g/L (0.65%); pH 5.7, en cajas Petri de 9 cm de diámetro y sobre una tela previamente estéril para facilitar la toma de muestra. Se estratificaron a 4°C por 3 días en obscuridad. Luego fueron transferidas al cuarto de cultivo vegetal bajo condiciones controladas de temperatura a 24 °C y un fotoperiodo de 16 horas-luz/8 horas-obscuridad. Se realizó la toma de muestra de semilla seca (tiempo 0) y durante la etapa de establecimiento de la plántula, es decir a los 2, 4, 5, 6, 7 y 8 días post-estratificación.

#### **4. Extracción de proteína.**

El tejido colectado durante la etapa de establecimiento de la plántula, fue congelado con nitrógeno líquido. Posteriormente se maceraron las muestras mediante un politrón, se adicionaron 400 µl de buffer de extracción de GUS, que contiene buffer de fosfato de sodio, pH 7.0, 50 mM, 10 mM β-mercaptoetanol, Na<sub>2</sub>EDTA pH 8.0 10 mM, sarcosyl 0.1% y Tritón X-100 0.1%. Se siguió el protocolo descrito por Jefferson (1987). Las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se transfirió a tubos, de los cuales se tomaron 2.5 µl del extracto a los que se les adicionó 797.5 µl de agua y 200 µl del buffer para obtener la concentración de proteína deseada. El contenido de proteína de los extractos se determinó por el método de Bradford (Bio-Rad) (Bradford *et al.*, 1976).

#### **5. Determinación fluorométrica de la actividad de GUS.**

El análisis fluorométrico de la actividad de GUS se realizó usando el sustrato 4-methylumbelliferyl β-D-Glucuronide (4-MU) (Research Organics, Inc.) de acuerdo al procedimiento descrito por Jefferson *et al.* (1986) que detecta picomoles de 4-methylumbelliferyl (4MU) por miligramo de proteína por minuto. La cuantificación de la actividad de GUS se realizó con un fluorímetro DyNA Quant™ 200 (Hoefer).

## VI.- RESULTADOS

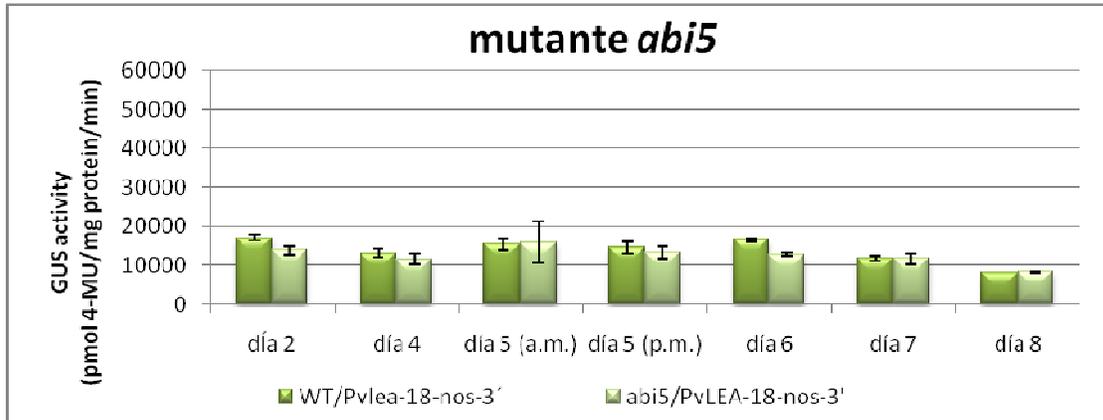
---

**1.- Análisis del efecto de mutantes insensibles a ABA sobre los patrones de expresión del gen reportero GUS en presencia o no de la región 3'-no traducida (3'-NT) del gen *PvLEA-18* durante la etapa de establecimiento de la plántula.**

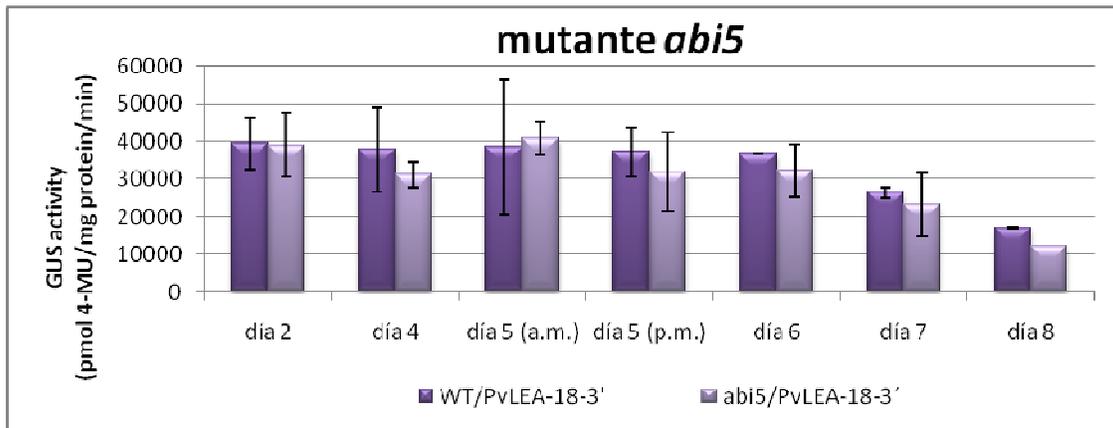
Con la finalidad de obtener información respecto a la participación de ABA sobre la expresión del gen *PvLEA-18* se monitoreó la expresión del gen reportero GUS a través de la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa (ver Materiales y Métodos), utilizando las plantas transgénicas de *A. thaliana* transformadas con las construcciones 5'-*PvLEA-18/GUS/PvLEA-18-3'* ó 5'-*PvLEA-18/GUS/nos-3'* (Moreno and Covarrubias, 2001) y las plantas mutantes *abi1-1*, *abi3-1* ó *abi5* conteniendo las construcciones 5'-*PvLEA-18/GUS/PvLEA-18-3'* ó 5'-*PvLEA-18/GUS/nos-3'*. Para ello, se obtuvo proteína tanto de semilla seca como de la etapa de establecimiento de las plántulas (cubriendo un período de 7 días de crecimiento post-estratificación). A partir de estos extractos se determinó por análisis fluorométrico la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa. Experimentos como el que se describe arriba se llevaron a cabo tres veces de manera independiente cuidando que se reprodujeran fielmente las condiciones de crecimiento y la toma de las muestras.

### **1.a. Efecto de la falta de las proteínas ABI3 y ABI5**

Los resultados de la Figura 1a muestran las actividades de GUS obtenidas durante la etapa de establecimiento de la plántula en la línea parental y en la mutante *abi5* que llevan la construcción *PvLEA-18/GUS/nos-3'*. El efecto de la falta de la proteína ABI5 durante esta etapa se ve reflejado sólo al día 6, en donde se puede apreciar que la actividad de GUS es ligera pero significativamente menor que la de las plantas con ABI5 silvestre. Estos resultados indican que la región promotora del gen *PvLEA-18* posee elementos *cis* que permiten que ABI5 active ligeramente la expresión de este gen, al menos en las condiciones de crecimiento analizadas.



**Figura 1a.** Análisis de la expresión del gen reportero GUS en plantas sensibles a ABA 5'-*PvLEA-18/GUS/nos-3'*, así como en las plantas insensibles a ABA obtenidas de las cruzas *abi5xPvLEA-18/GUS/nos-3'*, bajo condiciones óptimas de crecimiento. Las plantas fueron crecidas en medio MS a 24°C bajo fotoperiodo de 16 horas luz/8 oscuridad. Se graficó el promedio de tres experimentos independientes.

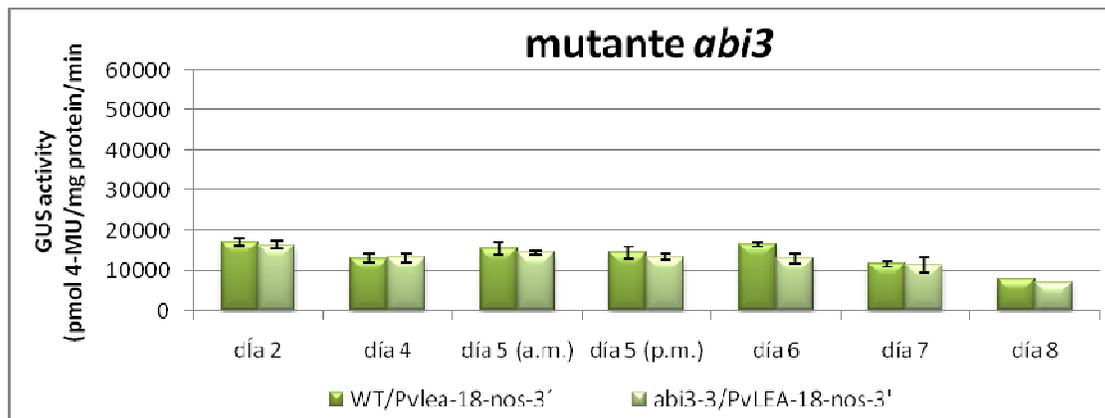


**Figura 1b.** Análisis de la expresión del gen reportero GUS en plantas sensibles a ABA 5'-*PvLEA-18/GUS/PvLEA18-3'*, así como en las plantas insensibles a ABA obtenidas de las cruzas *abi5xPvLEA-18/GUS/PvLEA-18-3'*, bajo condiciones óptimas de crecimiento. Las plantas fueron crecidas en medio MS a 24°C bajo fotoperiodo de 16 horas luz/8 oscuridad. Se graficó el promedio de tres experimentos independientes.

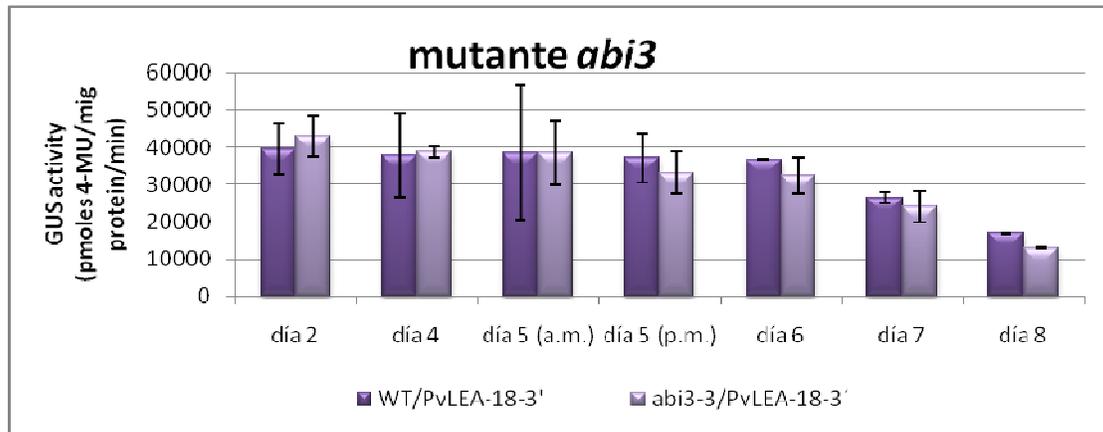
En la Figura 1b se muestran las actividades de GUS obtenidas a partir de plantas mutantes *abi5* que llevan la construcción *PvLEA-18/GUS/PvLEA18-3'*, durante la etapa de establecimiento de la plántula. Los datos muestran, por un lado, que la región 3'NT del gen *PvLEA18* ejerce un efecto incrementador sobre la expresión de GUS, lo que indica que esta región 3'NT también tiene una regulación positiva sobre la traducción de este gen bajo condiciones óptimas de crecimiento, en una etapa en la que la plántula se encuentra en crecimiento activo. Este resultado apoya los resultados obtenidos en plántulas de frijol durante etapas similares (Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001). Sin embargo, este aumento en la actividad de GUS anula la ligera disminución en la expresión de esta enzima en el día 6 provocada por la ausencia de

ABI5. También en esta figura puede observarse una ligera disminución de la actividad de GUS en las plántulas que llevan la construcción *PvLEA-18/GUS/PvLEA-18-3'* durante el día 8, esta disminución refleja la participación de ABI5 como regulador positivo durante este día y sólo en las plántulas con la construcción antes mencionada.

Como se muestra en las Figuras 2a y 2b, los resultados obtenidos con la mutante *abi3* son similares a los obtenidos con la mutante *abi5*; es decir, la ausencia de ABI3 da lugar a una pequeña disminución en la actividad de GUS en el día 6 durante la etapa de establecimiento de la plántula. Este efecto ya no es detectable cuando la región 3'-NT del gen *PvLEA18* sustituye a la región 3'-NT de *NOS*, que dada la intensidad de su efecto positivo sobre la producción de GUS, impide detectar el efecto activador que ejerce ABI3 sobre el promotor del gen. Además, la ligera disminución en la actividad de GUS durante el día 8 es similar en las mutantes *abi3* y *abi5*, sólo en las plántulas que llevan la construcción *PvLEA-18/GUS/PvLEA-18-3'*. Lo que también refleja la participación de *ABI3* como regulador positivo del gen *PvLEA-18* al menos en esta etapa y condición analizada.



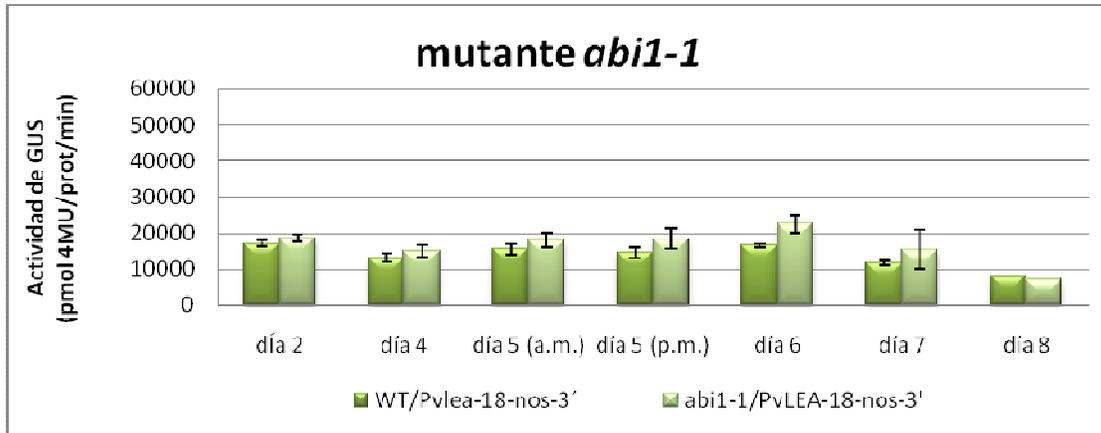
**Figura 2a.** Análisis de la expresión del gen reportero GUS en plantas sensibles a ABA 5'-*PvLEA-18/GUS/nos-3'*, así como en las plantas insensibles a ABA obtenidas de las cruces *abi3xPvLEA-18/GUS/nos-3'*, bajo condiciones óptimas de crecimiento. Las plantas fueron crecidas en medio MS a 24°C bajo fotoperiodo de 16 horas luz/8 oscuridad. Se graficó el promedio de tres experimentos independientes.



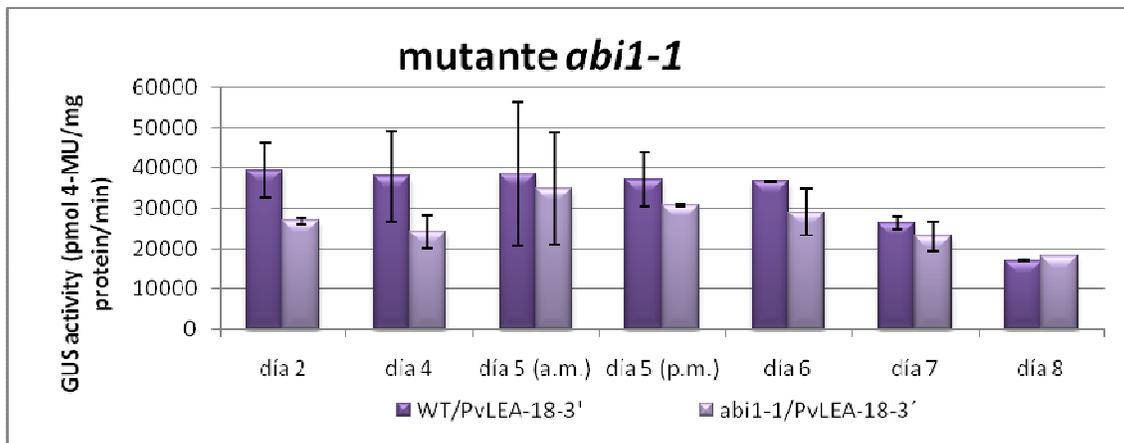
**Figura 2b.** Análisis de la expresión del gen reportero GUS en plantas sensibles a ABA 5'-PvLEA-18/GUS/nos-3', así como en las plantas insensibles a ABA obtenidas de las cruces *abi3*xPvLEA-18/GUS/nos-3', bajo condiciones óptimas de crecimiento. Las plantas fueron crecidas en medio MS a 24°C bajo fotoperiodo de 16 horas luz/8 oscuridad. Se graficó el promedio de tres experimentos independientes.

### ➤ Efecto de la falta de la proteína ABI1

En el caso de la mutante *abi1-1*, cabe recordar que esta mutación genera una proteína ABI1 alterada debido al cambio de una sola base en la secuencia del gen, aún así permite la síntesis de esta proteína pero con una función modificada, lo cual genera una mutante dominante. Esto significa que *abi1-1* es una proteína en la que su actividad como regulador negativo está exacerbada, de tal forma que se mantiene siempre en una conformación en la que su efecto negativo es constante, por lo que se conoce como una mutante dominante negativa. Así, los resultados en las Figuras 3a y 3b muestran que esta proteína ejerce un ligero efecto sobre la expresión del gen *PvLEA-18* dependiente de su promotor en el día 6 durante esta etapa del desarrollo de la planta. El pequeño aumento en la actividad de GUS al día 6 en las plantas con *abi1-1* muestra que esta proteína modificada induce un efecto activador sobre la expresión de GUS. Como en los casos anteriores este efecto ya no se detecta al incrementarse la expresión de GUS por la presencia de la región 3'-NT del gen *PvLEA-18*. Por otro lado, aunque la presencia de la región 3'-NT del gen *PvLEA-18* tampoco parece cambiar este patrón de expresión en presencia de la proteína ABI mutante, es posible apreciar que existe una disminución significativa en la actividad de GUS en el día 2, en el que las plántulas aún se encuentran en el período de estratificación en frío. Llama la atención que esta disminución sólo se detecta en presencia de la región 3' NT del gen *PvLEA18*, lo cual indica que el efecto como regulador negativo de ABI1 se da en este gen a través de esta región 3'NT.



**Figura 3a.** Análisis de la expresión del gen reportero GUS en plantas sensibles a ABA 5'-PvLEA-18/GUS/nos-3', así como en las plantas insensibles a ABA obtenidas de las cruzas *abi1-1*xPvLEA-18/GUS/nos-3', bajo condiciones óptimas de crecimiento. Las plantas fueron crecidas en medio MS a 24°C bajo fotoperiodo de 16 horas luz/8 oscuridad. Se graficó el promedio de tres experimentos independientes.



**Figura 3b.** Análisis de la expresión del gen reportero GUS en plantas sensibles a ABA 5'-PvLEA-18/GUS/PvLEA-18-3', así como en las plantas insensibles a ABA obtenidas de las cruzas *abi1-1*xPvLEA-18/GUS/PvLEA-18-3', bajo condiciones óptimas de crecimiento. Las plantas fueron crecidas en medio MS a 24°C bajo fotoperiodo de 16 horas luz/8 oscuridad. Se graficó el promedio de tres experimentos independientes.

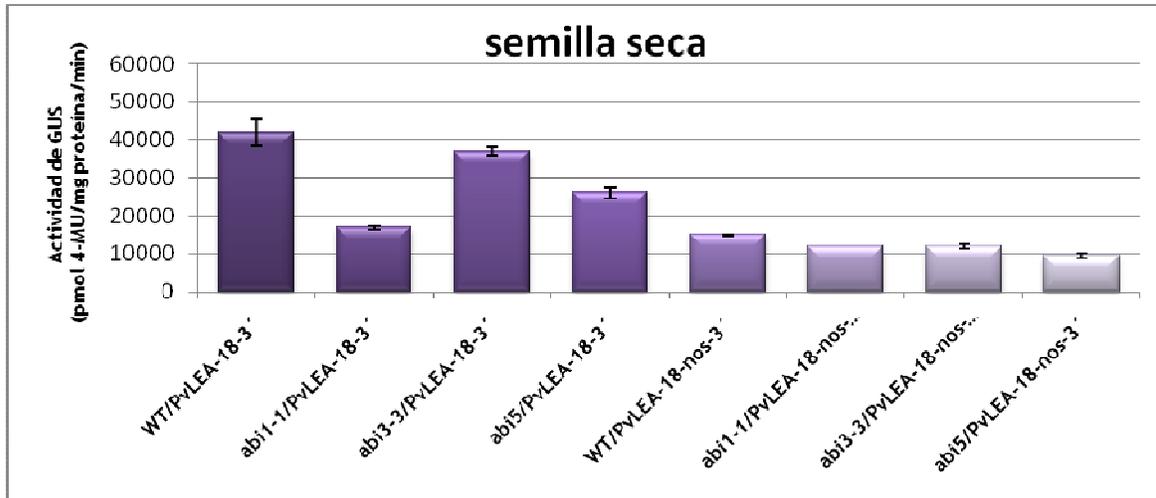
Estos resultados, junto con el hecho descubierto en nuestro laboratorio, que indica que esta región 3' NT regula la expresión del gen *PvLEA-18* a nivel traduccional, sugiere que el RNAm del gen *PvLEA-18* acumulado en la semilla (o sintetizado *de novo*) se traduce durante la germinación y durante la etapa de establecimiento de la plántula. Esto es consistente con un reporte de la literatura en donde se observó que algunas proteínas LEA de algodón se sintetizan *de novo* durante las primeras horas de la germinación (Roberts, 1993) y, por otro lado, debilita la idea de que las proteínas LEA y sus RNAm sólo se degradan en estas etapas. Estos resultados también sugieren que la síntesis de

algunas proteínas LEA se mantiene durante una etapa corta post-estratificación y durante el establecimiento de la plántula para contribuir también a la protección de la plántula durante estas primeras etapas de su desarrollo en las cuales pueden ser muy sensibles a los cambios ambientales.

## **2. Análisis del efecto de mutantes insensibles a ABA sobre los patrones de expresión del gen reportero GUS en presencia o no de la región 3'-no traducida del gen *PvLEA-18* en la semilla seca.**

De los datos en la Figura 4 resulta evidente que el efecto estimulante que ejerce la región 3'-NT sobre la expresión de la proteína *PvLEA-18* también se da durante el desarrollo de la semilla, ya que la cantidad de GUS acumulada en la semilla seca siempre es mayor en las semillas provenientes de las plantas que contienen la construcción *PvLEA-18/GUS/PvLEA-18-3'*. De esta gráfica también se puede apreciar que la presencia de la proteína *abi1-1* dominante negativa ejerce un efecto negativo sobre la expresión de GUS, el cual es patente cuando la expresión se modula por la región 3'-NT del gen *PvLEA-18*. Este efecto es similar al que se observa en el día 2 del experimento anterior. Esto sugiere que *ABI1* actúa como un regulador positivo de la expresión de la proteína *PvLEA-18*, en contraste con la función como regulador negativo atribuida a esta proteína, o que *ABI1* regula negativamente a un regulador positivo de la expresión de la proteína *PvLEA-18*. Cualquiera que sea la explicación resulta sorprendente que esta proteína, a la cual se le atribuye su función en tejidos vegetativos, particularmente en la regulación del cierre y la apertura de los estomas, se presente como un regulador de la vía de transducción de ABA durante el desarrollo de la semilla.

Por otro lado, al comparar las actividades de GUS que presentan las semillas que carecen de *ABI5* con las semillas silvestres es claro que la actividad de GUS es menor en las semillas de plantas sin *ABI5* que en las semillas en las que *ABI5* es funcional, lo que indica que en esta etapa del desarrollo *ABI5* actúa como un regulador positivo de la expresión del gen *PvLEA18*. En contraste, no fue posible detectar diferencias significativas entre la actividad de GUS de semillas silvestres y de semillas que carecen de *ABI3*, lo que sugiere que a diferencia de otros genes *LEA*, la expresión del gen *PvLEA18* durante el desarrollo de la semilla no requiere de *ABI3*.



**Figura 4.** Análisis de la expresión del gen reportero GUS en semilla seca de plantas sensibles a ABA 5'-*PvLEA-18/GUS/nos-3'* y 5'-*PvLEA-18/GUS/PvLEA-18-3'*, así como en la semilla seca de plantas insensibles a ABA obtenidas de las cruces de las mutantes *abi5*, *abi3* y *abi1-1* con *PvLEA-18/GUS/nos-3'* o con *PvLEA-18/GUS/PvLEA-18-3'*. Se graficó el promedio de tres experimentos independientes.

## VII.- DISCUSIÓN

---

Durante el déficit hídrico, las plantas sufren cambios fisiológicos, así como alteraciones en la expresión génica. Un cambio típico en la expresión génica durante el déficit hídrico es la inducción de genes que normalmente se expresan abundantemente en la embriogénesis tardía (*Lea*) (Baker *et al.*, 1988). Las proteínas LEA presentan un marcado incremento de su expresión en embriones en los últimos estados de desarrollo de la semilla, cuando esta pierde del 90% al 95% de su contenido de agua, algunas de estas proteínas también se expresan en tejido vegetativo. La expresión de algunos genes *LEA* durante diferentes tipos de estreses abióticos es mediada por ABA a través de diferentes clases de secuencias en el DNA, como es el caso de los elementos en el promotor que actúan en *cis* conocidos como ABRE y los que actúan en *trans* como los factores de transcripción, bZIP.

El gen *PvLEA-18* codifica para una proteína que se acumula durante la embriogénesis tardía y en respuesta a déficit hídrico en tejido vegetativo en frijol. Sabemos que tanto el transcrito como la proteína se van acumulando a lo largo del desarrollo de la semilla alcanzando niveles máximos en la etapa de deshidratación de la semilla, cuando esta alcanza su madurez. También sabemos que los niveles de este transcrito empiezan a disminuir una vez que la semilla de frijol se coloca en un ambiente húmedo y que ya no es detectable por experimentos tipo Northern después de 48 h de imbibición; en tanto que la proteína es detectable aún después de seis días de imbibición. Los resultados obtenidos de plantas de frijol, por otro lado, demostraron que esta proteína y su transcrito se acumulan en respuesta a la limitación de agua en los diferentes órganos de la planta, en mayores niveles en las raíces que en las hojas. Un efecto similar se observó cuando las plantas se sometieron a tratamientos con altos niveles de ABA (100  $\mu\text{M}$ ) en la solución de riego. A diferencia de muchos otros genes o proteínas LEA, la proteína *PvLEA-18* y su transcrito también se acumulan durante el desarrollo de la planta de frijol en condiciones normales, en particular, en las zonas en crecimiento del hipocotilo y de la raíz, las cuales muestran potenciales osmóticos e hídricos menores a las regiones que no están creciendo, y también en las regiones meristemáticas como son los primordios de las raíces secundarias (Colmenero-Flores, 1999). Un patrón de expresión similar se detectó en plantas de *Arabidopsis* que fueron transformadas con una construcción en la que la región promotora del gen *PvLEA18* se fusionó al gen reportero *GUS*, con o sin la región 3'-NT del gen *PvLEA-18*. Los experimentos con estas construcciones permitieron definir que la región 3'-NT del gen *PvLEA-18* funciona como

un “estimulador” de la expresión de esta proteína y que este efecto es el responsable de los mayores niveles de expresión, detectados a través de GUS, en respuesta a tratamientos por déficit hídrico. Sin embargo, se demostró que este incremento en la expresión inducida por la limitación de agua ocurre mayoritariamente de una forma independiente del ABA (Moreno y Covarrubias, 2001).

Aunado a todo lo anterior, el análisis de la secuencia de nucleótidos de este gen permitió detectar que dentro de su región promotora existen un elemento ABRE, tres cajas-G, dos elementos MYB, dos elementos MYC y un elemento as1 (Moreno y Covarrubias, 2001). Debido a la presencia del elemento ABRE, podría pensarse que la expresión de este gen está modulada por una vía dependiente de ABA; ya sea, parcialmente, durante la respuesta a estrés y/o durante alguna etapa del desarrollo de la planta.

Estas observaciones nos llevaron a proponer que la expresión de este gen podría depender del ABA durante el desarrollo de la semilla o el establecimiento de la plántula, etapas en las que se ha descrito que ABA juega un papel preponderante.

#### **Análisis de la expresión del gen *PvLEA-18* en mutantes insensibles a ABA durante la etapa de establecimiento de la plántula.**

Se sabe que el rompimiento de la dormancia, que ocurre antes de establecer el crecimiento de la plántula es una fase frágil en el ciclo de vida de las plantas. Durante esta transición, las plantas pueden ser capaces de monitorear el estatus hídrico en el ambiente y de esta manera establecer sus respuestas de adaptación contra el estrés. Desde la dormancia hasta la etapa de establecimiento de la plántula, el ABA juega un papel importante en la respuesta al estrés hídrico, por lo tanto se asume que el ABA regula estos procesos. Sin embargo, los mecanismos moleculares de este proceso, así como su relevancia fisiológica aún no están del todo claros. López-Molina *et al.* (2002) propusieron que el ABA participa en esta etapa de establecimiento después de demostrar que si las plántulas se tratan con ABA, los transcritos de ABI3 y de ABI5 se acumulan en esta etapa y, que algunos genes de respuesta a estrés (tipo *LEA*) dependen de estos factores para su expresión en este estadio de desarrollo (figura a). Adicionalmente estos datos sugirieron que esta etapa funciona como una etapa de verificación de las condiciones del ambiente, lo cual le permitiría a la planta decidir si

disminuye o detiene su crecimiento o si prosigue con el mismo. Esta hipótesis resulta atractiva, ya que es consistente pensar que la expresión de genes de estrés permitiría a la planta prevenir y enfrentar una situación de agobio ambiental que pudiera arriesgar su supervivencia. Por lo dicho arriba, nos preguntamos si el gen *PvLEA-18* pudiera funcionar como uno de estos genes de estrés cuyo producto pudiera ayudar a la planta a prevenir los daños provocados por condiciones ambientales adversas y, por tanto, si se expresaba en esta etapa de desarrollo bajo control de una vía dependiente de ABA. Los resultados de este trabajo demuestran que en efecto el gen *PvLEA18* se expresa en esta etapa del desarrollo de la planta y que, al menos, en la ventana de sensibilidad a ABA que tienen las plántulas de *Arabidopsis* en esta etapa( al sexto día) esta expresión depende de los factores ABI3 y ABI5. El efecto activador de estos factores se deduce de la disminución en las actividades de GUS, en el día 6 post-estratificación, en las plantas que carecen de estas proteínas comparadas con las plantas silvestres (figura a). Como se hace notar en la sección de resultados, este efecto ya no es detectable cuando el gen reportero se fusiona a la región 3'-NT del gen *PvLEA-18*, lo que sugiere que la expresión de este gen depende principalmente de esta región, también en estas condiciones.

Si ahora se considera el hecho de que la región 3'-NT del gen *PvLEA-18* regula la expresión de este gen a nivel traduccional incrementando la síntesis de la proteína como lo demuestran los datos de M. Battaglia en nuestro laboratorio (Battaglia y Covarrubias, en preparación), ésto nos lleva a sugerir que la expresión de la proteína *PvLEA-18* en esta etapa se da, ya sea a partir del RNA acumulado en la semilla y gracias a que esta región del transcrito favorece su traducción, o bien a partir de RNA cuya síntesis *de novo* está activada por reguladores diferentes a ABI3 y ABI5 o por un efecto sinérgico de diferentes activadores positivos adicionales a éstos. De acuerdo al análisis de la secuencia promotora de este gen, los otros FTs que posiblemente podrían regular este gen serían los factores MYB o MYC, que también se han involucrado en la respuesta dependiente de ABA (ver Introducción).

Los resultados de este trabajo demuestran que en efecto el gen *PvLEA-18* se expresa en esta etapa del desarrollo de la planta, pero al parecer su expresión no depende importantemente de ABA, al menos a través de los factores ABI3 y ABI5. Sin embargo, cabe mencionar que fue posible detectar que el promotor del gen *PvLEA-18* es capaz de responder, ligeramente, a la activación por ABI3 y por ABI5 durante una ventana muy pequeña de esta etapa; ya que las actividades de GUS fueron menores en las plantas que carecen de estas proteínas comparadas con las plantas silvestres sólo en el día 6

post-estratificación (figura a). Como se hace notar en la sección de resultados, este efecto ya no es detectable cuando el gen reportero se fusiona a la región 3'-NT del gen *PvLEA-18*, lo que sugiere que la expresión de este gen depende principalmente de esta región, también en estas condiciones.

Si ahora se considera el hecho de que la región 3'-NT del gen *PvLEA-18* regula la expresión de este gen a nivel traduccional incrementando la síntesis de la proteína como lo demuestran los datos de M. Battaglia en nuestro laboratorio (Battaglia y Covarrubias, en preparación), ésto nos lleva a sugerir que la expresión de la proteína *PvLEA-18* en esta etapa se da, ya sea a partir del RNA acumulado en la semilla y gracias a que esta región del transcrito favorece su traducción, o bien a partir de RNA cuya síntesis *de novo* está activada por reguladores diferentes a ABI3 y ABI5 o por un efecto sinérgico de diferentes activadores positivos adicionales a éstos. De acuerdo al análisis de la secuencia promotora de este gen, los otros FTs que posiblemente podrían regular este gen serían los factores MYB o MYC, que también se han involucrado en la respuesta dependiente de ABA (ver Introducción).

En particular, en la vía de señalización mediada por ABA parecen estar involucradas redes de proteínas tipo cinasas y fosfatasa que regulan de manera positiva o negativa dicha vía. La participación de las enzimas PP2C en la señalización por ABA fue sugerida cuando se caracterizaron las mutantes insensibles a dicha hormona *abi1-1* y *abi2-1* de *Arabidopsis*. Estas dos mutantes presentan alteraciones pleiotrópicas tales como la insensibilidad al ABA durante la germinación de la semilla y durante el crecimiento de la plántula, la disminución de la dormancia y la regulación estomática alterada (Allen *et al.*, 1999; Finkelstein y Somerville, 1990; Koorneef *et al.*, 1984; Leung *et al.*, 1997). Las proteínas tipo fosfatasa 2C tienen diversas funciones en la regulación de vías de señalización en animales, levaduras y plantas. ABI1 es un regulador negativo en la vía de señalización mediada por ABA en *Arabidopsis*. Dado que hasta el momento la información acerca de la participación de la proteína ABI1 en la regulación de genes de respuesta a estrés es muy limitada, decidimos analizar la participación de esta proteína en la regulación de la expresión del gen *PvLEA-18* durante la etapa de establecimiento de la plántula. Los resultados obtenidos sugieren que ABI1, como sucede con ABI3 y ABI5, tienen una participación secundaria en la regulación del gen *PvLEA-18* a través de su promotor como regulador negativo. La razón de esta afirmación es porque sólo en el día seis post-estratificación, la actividad de GUS en las plantas mutantes *abi1-1* es ligeramente mayor que en las plantas silvestres. Al igual que sucede en las mutantes *abi3* y *abi5*, este efecto se anula cuando la región 3' NT está presente. A su vez, la ausencia de un efecto relevante de la mutante *abi1-1* correlaciona con datos obtenidos

por Arroyo (2003), en los que el gen *ABI1* no ejerce ningún efecto sobre plántulas crecidas en condiciones control y en condiciones de deshidratación.

Por otro lado, cabe hacer notar que aunque se ha demostrado que *ABI1* funciona como un regulador negativo de la vía de señalización mediada por ABA, nuestros datos sugieren que durante la etapa de estratificación (día 2 de la cinética) *ABI1* está participando como regulador positivo. Este efecto sólo se detecta en la línea que lleva la región 3'-NT del gen *PvLEA-18*, lo que indica que la regulación por *ABI1* en este período de desarrollo ocurre a través de la región 3' NT. A su vez esto sugiere que la o las proteínas que están implicadas en favorecer la traducción de este gen junto con su región 3'NT están reguladas por ABA a través de *ABI1*. Ahora también sabemos que *ABI1* regula de manera positiva a éste gen en la semilla seca, por lo que parte del transcrito acumulado a los dos días de estratificación puede ser parte del transcrito que viene aún de la semilla seca, lo cual refleja una participación del gen *PvLEA-18* en esta etapa de desarrollo, la cual a pesar de ser una condición que favorece el rompimiento de la dormancia, es una condición de estrés.

### **Participación del ABA en la regulación de la expresión del gen *PvLEA-18* en la semilla seca**

La maduración de la semilla es una fase importante del desarrollo de la planta durante la que el embrión cesa su crecimiento, acumula productos de almacenamiento, se diferencian los tejidos de protección y desarrolla tolerancia a la desecación para poder entrar en dormancia. La regulación temporal y espacial de todos los eventos antes mencionados requiere la acción concertada de algunas vías de señalización que integran información de programas genéticos, señales hormonales y metabólicas. ABA no sólo regula el desarrollo de la semilla, sino también el crecimiento post-germinativo y la apertura estomática. Durante la maduración de la semilla la señalización mediada por ABA está estrechamente relacionada a la expresión de cinco genes reguladores: *ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 (ABI5)*, *ABSCISIC ACID INSENTITIVE 3 (ABI3)*, *FUSCA3 (FUS3)*, *LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1)* y *LEC2*.

La presencia de elementos de respuesta a ABA en la región promotora del gen *PvLEA-18* nos ha llevado a pensar que dicho gen puede estar regulado por algunos de los genes arriba mencionados, durante el desarrollo de la semilla. Con los resultados obtenidos en la semilla seca, ahora sabemos que, al menos para la regulación del gen *PvLEA-18* a través de su región promotora, el factor transcripcional *ABI5* regula de manera positiva al promotor del gen, tanto en las semillas que llevan el promotor del gen *PvLEA-18*

fusionado a la región *nos-3'* como a la región *PvLEA-18-3'*. Sin embargo, a pesar de que ABI3 ejerce un efecto positivo sobre la regulación de algunos genes *LEA* en semilla seca, en el caso del gen *PvLEA-18*, al parecer, no participa. Esto lleva a pensar que la regulación de la expresión de cada gen *LEA* varía de acuerdo a los diferentes órganos de la planta, en semilla seca, en respuesta a ABA, en diferentes mutantes alteradas en la respuesta a ABA o en la maduración de la semilla, así como en ausencia de estrés abiótico. Esta suposición es consistente con los resultados obtenidos por Bies-Ethève *et al.*, (2008) y colaboradores, quienes observan que diferentes genes *LEA* responden diferencialmente a ABA, a través de FTs diferentes. Incluso, como en el caso del gen *PvLEA-18*, detectan que algunos reguladores caracterizados como positivos muestran un efecto represor (Figura a).

Hasta ahora sabemos que la participación de la proteína ABI1 se da a través de una regulación negativa en la vía de señalización mediada por ABA, y que su participación se da principalmente en tejido vegetativo. Con los resultados obtenidos en este trabajo, sugerimos la participación de *ABI1* como un regulador positivo del promotor del gen *PvLEA-18* en la semilla seca. Aunque no existen datos hasta ahora donde se vea la participación de *ABI1* como regulador positivo en semilla seca, nosotros sugerimos que *ABI1* a su vez está regulando de manera negativa, a otro u otros reguladores negativos que pudieran estar participando en la regulación de la expresión del gen *PvLEA-18* a través de su promotor (Figura b).

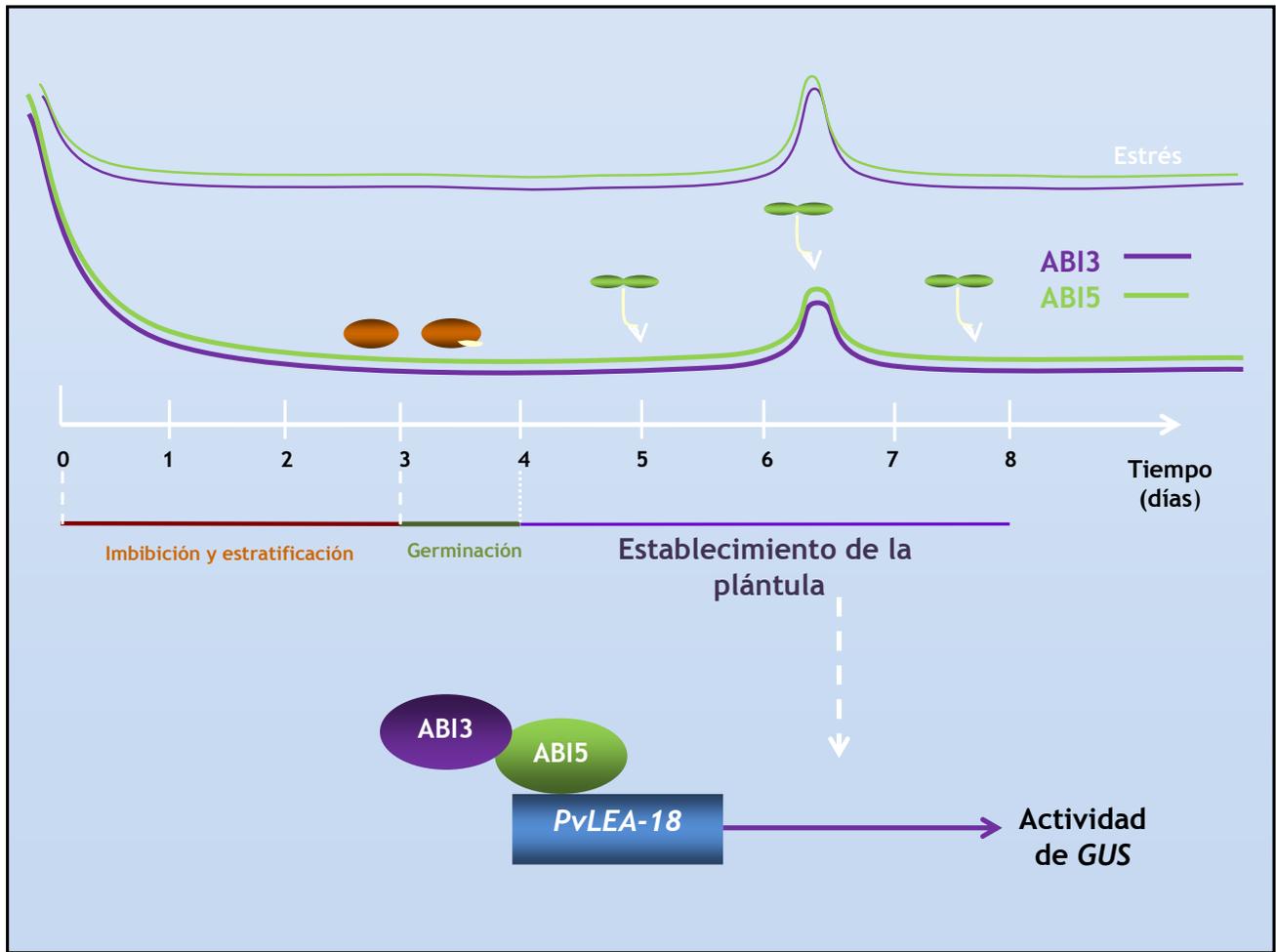


Figura a. Modelo sugerido de acuerdo a los resultados obtenidos de la participación de ABI3 y ABI5 en la regulación de la expresión del gen *PvLEA-18* en la etapa de establecimiento de la plántula.

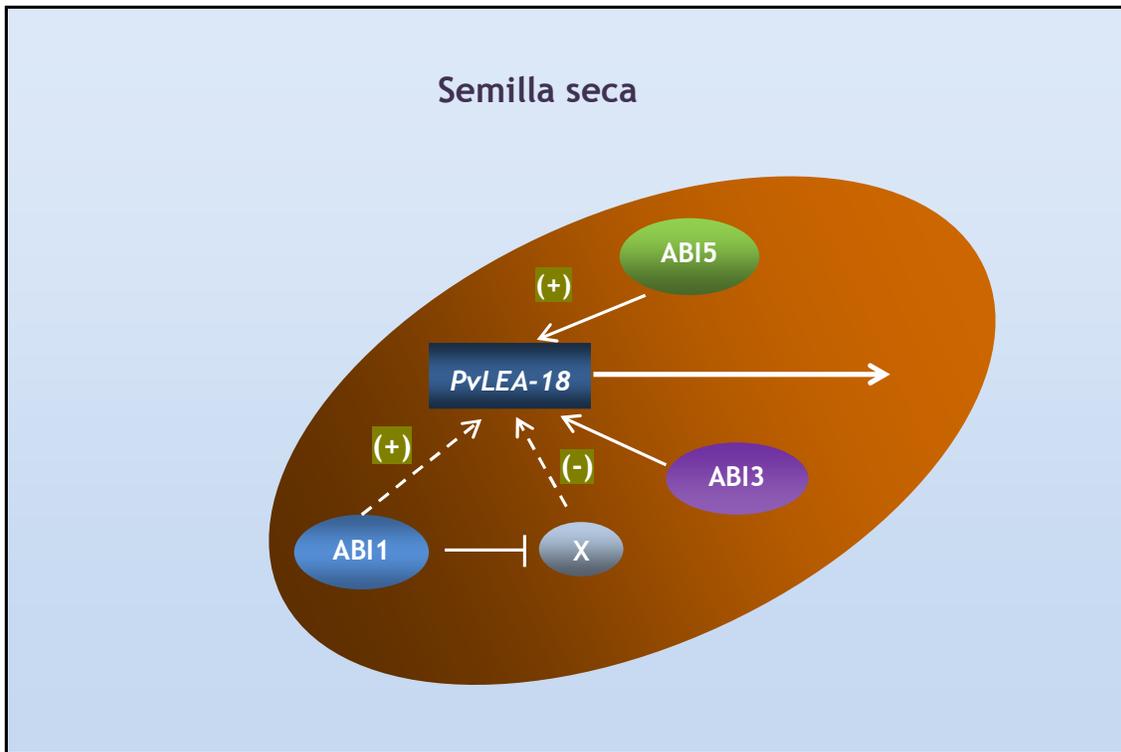


Figura b. Modelo sugerido a partir de los resultados obtenidos sobre la participación de los factores transcripcionales ABI3 y ABI5 en la regulación de la expresión del gen PvLEA-18 en la semilla seca.

## VIII.- CONCLUSIONES

---

- La regulación a través de la región 3' del gen *PvLEA-18* promueve una mayor expresión de GUS, tanto en la semilla seca como durante el establecimiento de la plántula. Dado el efecto regulatorio sobre la traducción del gen *PvLEA-18* ejercido por su región 3'-NT, sugerimos que este gen se traduce activamente durante la germinación y durante la etapa de establecimiento de la plántula.
- Las proteínas ABI5, ABI3 y ABI1 tienen un ligero efecto regulador sobre la expresión del gen *PvLEA-18*, durante la etapa de establecimiento de la plántula. Dado que se detecta una actividad de GUS considerable en esta etapa se podría pensar que la expresión del gen *PvLEA-18* depende una vía de transducción independiente de estos FTs, o bien de una vía de transducción independiente de ABA. Este efecto podría ser más evidente bajo condiciones de estrés o en presencia de altas concentraciones de ABA.
- La proteína ABI5 regula de manera positiva la expresión del gen *PvLEA-18* en la semilla seca.
- El gen *ABI1* ejerce un control positivo en la regulación llevada a cabo por la región 3' del gen *PvLEA-18*.

## IX. PERSPECTIVAS

---

- A pesar de que la expresión del gen *PvLEA-18* en condiciones de deshidratación se da en su mayor parte por una vía independiente de ABA, también sabemos que parte de esa respuesta es dependiente de ABA. Los resultados de éste trabajo sugieren que la expresión del gen *PvLEA-18* depende de una vía de señalización mediada por ABA a través de los factores transcripcionales ABI3 y ABI5, al menos durante la ventana donde se da el establecimiento de la plántula en condiciones óptimas de crecimiento. Para tener un mejor panorama sobre la participación de ABA durante la etapa de establecimiento de la plántula es necesario realizar un análisis de la expresión del gen *PvLEA-18* en los fondos mutantes *abi3* y *abi5* en condiciones de estrés hídrico y en presencia de ABA exógeno.
- Sería conveniente analizar los patrones de expresión del gen reportero GUS a partir de mediciones de su transcrito y/o proteína en la semilla seca, debido a que las actividades obtenidas en este órgano no reflejan lo esperado. Es decir, la condición de la semilla de poca cantidad de agua podría afectar la actividad de GUS y debido a esto se detectan actividades muy bajas.
- Se pretende hacer un análisis más a fondo sobre la participación de ABI1 como regulador positivo del gen *PvLEA-18* en la semilla seca, ya que no se conocen datos en la literatura donde ABI1 participe como regulador positivo de algún gen *LEA* en dicho órgano, sólo se sabe que participa como regulador negativo en la vía de señalización de ABA durante el crecimiento vegetativo.
- Dado que además de ABI3 y ABI5 existen algunos factores transcripcionales como FUS3, LEC1 y LEC2 que regulan el desarrollo de la semilla, se podría realizar un análisis de la regulación de dichos factores sobre la expresión del gen *PvLEA-18*.

## X.- REFERENCIAS

---

- Allen, G.J., Kuchitsu, K., Chu, S.P., Murata, Y. y Schroeder, J.J. (1999). *Arabidopsis abi1-1* and *abi2-1* phosphatase mutations reduce abscisic acid-induced cytoplasmic calcium rise in guard cells. *Plant Cell*. **11**: 1785-1798.
- Arroyo, E. (2003). Estudio sobre la regulación de la expresión de un gen que codifica una proteína LEA involucrada en la respuesta a sequía en frijol. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos.
- Azcon, J. y Talon, M. (1993). Fisiología y Bioquímica Vegetal. Interamericana-McGraw-Hill. España. Pag. 49.
- Baker, J.; Steele, C. y Dure, L.III (1988). Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Molecular Biology*. **11**: 277-291.
- Battaglia, M. (2008). Análisis de la participación de la región 3' del gen PvLEA-18 en la regulación de su expresión en respuesta a sequía. Tesis de Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Instituto de Biotecnología, UNAM.
- Battaglia, M., Olvera, Y., Garcia, A., Covarrubias, A. (2008). The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiology*. **148** (1): 6-24.
- Bertauche, N., Leung, J y Giraudat, J. (1996). Protein phosphatase activity of abscisic acid-insensitive 1 (*ABI1*) protein from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry*. **241**: 193-2000.
- Bewley, J.D. y Black M. Physiology of Developmental and Germination in Seeds. New York, NY: Plenum Press, pp. 199-268.
- Bies-Ethève, N.; Gaubier-Comella, P.; Debure, A.; Lassere, E.; Jobet, E.; Raynal, M.; Cooke, R y Delseny M. (2008). Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) protein gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*. **67**(1-2):107-24.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Annual Biochemistry*. **72**: 278-293.
- Bray, E. A. (1997). Plants response to water deficit. *Trends in Plant Science*. **2**: 48-54.
- Bray, E. A.; Bailey-Serres, J. y Weretilnyk, E. (2000). Response to abiotic stresses. En: Buchanan, B.B.; Gruissem, W. y Jones, R.L. (eds), *Biochemistry and Molecular Biology in Plants*. American Society of Plant Physiologist, Rockville, M.D. 1158-1203.
- Busk, P. y Pagés, M. (1998). Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Molecular Biology*. **37**:425-435.
- Campbell, S. y Close, T. (1997). Dehydrins: genes, proteins and associations with phenotypic trait. *New Physiology*. **137**: 61-74.

- Carles, C., Bies-Etheve, N., Aspart, L., León-Kloostereiel, K.M., Echeverria, M., y Delseny, M. (2002). Regulation of *Arabidopsis thaliana* Em genes. *Plant Journal*. **30** (3): 373-383.
- Chandler, M.P. y Robertson, M. (1994). Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology*. **45**: 113-141.
- Close, T.J. y Lammers, P.J. (1993). An osmotic stress protein of cyanobacteria is immunologically related to plant dehydrins. *Plant Physiology*. **101** (3): 773-9.
- Colmenero-Flores, J. M. (1997). Caracterización de genes que responden a déficit hídrico en *Phaseolus vulgaris*. Tesis de Doctorado en Biotecnología, UNAM.
- Colmenero-Flores, J.; Campos, F.; Garcarrubio, A. y 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.
- Creelman, R. y McCourt. (2008). The ABA receptors - we report you decide. *Current Opinion in Plant Biology*. **11**:474-478.
- Dure, L. III (1993a). Structural motifs in LEA proteins. In TJ Close, EA Bray, eds, Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, pp 91- 103.
- Dure, L. III (1993b). A repeating 11-mer amino acid motif and plant desiccation. *Plant Journal*. **3**: 363-369.
- Dure, L. III (1989). Crouch, M; Harada, J.; Ho, T-H.D.; Mundy, J.; Quatrano, R.; Thomas, T. y Sung, Z.R. Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Molecular Biology*. **12**: 475-486.
- Espelund, M.; Sæbøe- Larssen, S.; Hughes, D.W.; Galau, G.A.; Larsen, F. y Jakobsen, K.S. (1992). Late embryogenesis-abundant genes encoding proteins with different numbers of hydrophilic repeats are regulated differentially by abscisic acid osmotic stress. *Plant Journal*. **2**: 241-252.
- Finkelstein, R.R. (1990). Three classes of abscisic acid (ABA)-insensitive mutations of *Arabidopsis* define genes that control overlapping subsets of ABA responses. *Plant Physiology*. **94**: 1172-1179.
- Finkelstein R.R. y Somerville, C. (1990). Three classes of abscisic acid (ABA)-insensitive mutations of *Arabidopsis* define genes that control overlapping subsets of ABA responses. *Plant Physiology*. **94**: 1172-1179.
- Finkelstein, R.R. (1993). Abscisic acid-insensitive mutations provide evidence for stage-specific signal pathways regulating expression of an *Arabidopsis* late embryogenesis-abundant (*lea*) gene. *Molecular General Genetics*. **238**: 401-408.
- Finkelstein, R.R. (1994). Mutations at two new *Arabidopsis* ABA response loci are similar to the *abi3* mutations. *Plant Journal*. **5**: 765-771.

- Finkelstein, R.R.; Wang, M.L.; Lynch, T.J.; Rao, S. y Goodman, H.M. (1998). The *Arabidopsis* abscisic acid response locus *ABI4* encodes an APETALA 2 domain protein. *Plant Cell*. **10**: 1043-1054.
- Finkelstein, R.R. y Lynch, T.J. (2000). The *Arabidopsis* abscisic acid response gene *ABI5* encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell*. **12**: 599-609.
- Finkelstein, R.R.; Gampala, S.S. y Rock, C.D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell*. S15-S45.
- Galau, T.A y Close, T.J. (1992). Sequences of the cotton group 2 LEA/RAB/Dehydrin proteins encoded by *Lea3* cDNAs. *Plant Physiology*. **98** (4): 1523-1525.
- Galau, A.G.; Wang, Y. y Hughes, W.D. (1993). Cotton *LEA5* and *LEA14* encode atypical embryogenesis-abundant proteins. *Plant Physiology*. **101**: 695-696.
- Garay-Arroyo, A.; Colmenero-Flores, J.M.; Garciarrubio, A. y Covarrubias, A. A. (2000). Highly Hydrophilic Proteins in Prokaryotes and Eucaryotes are common during conditions of water deficit. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**: 5668-5674.
- Giraudat, J.; Hauge, B.M.; Valon, C.; Smalle, J.; Parcy, f. y Goodman, H.M. (1992). Isolation of the *Arabidopsis* *ABI3* gene by positional cloning. *Plant Cell*. **4**: 1251-1261.
- Giraudat, J.; Sylvain, M.; Gosti, F.; Guerrier, D. y Vavasseur, D. (2001). The *ABI1* and *ABI2* protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant Journal*. **25** (3): 295-303.
- Gosti, F.; Beaudoin, N.; Serizet, C.; Webb, A. Vartanian, N. y Giraudat, J. (1999). *ABI1* protein phosphatase 2C is a negative regulator of abscisic acid signaling. *Plant Cell*. **11**: 1897-1909.
- Gultinan, M.J., Marcotte, W.R., y Quantrano, R.S. (1990). A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science*. **250**: 267-271.
- Goday, A., Jenssen, A. Culiáñez-Maciá, A.F., Albé, M.M., Figueras, M., Serratosa, J., Torrent, M. y Pagès, M. (1994). The maize abscisic acid-responsive protein Rab 17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell*. **6**: 351-360.
- Ingram, J. y Bartels, D. (1996). The molecular bases of dehydration tolerance in plants. *Annual Review Plant Physiology. Plant Molecular Biology*. **47**:377-403.
- Iwasaki, t., Kiyosue, T., Ymaguchi-Shinozaki, K., y Shinozaki, K. (1997). 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.
- Jefferson, R.A.; Burgess, S.M. y Hirsh, D. (1986).  $\beta$ -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *EMBO Journal*. **3**:8447-8451.
- Jefferson, R.A.; Kavanagh, T.A. y Bevan, M.W. (1987). GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gen fusion marker in higher plants. *EMBO Journal*. **6**: 3901-3907.

- Koorneef, M.; Reuling, G. y Kaessen, M. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. 61: 377-383.
- Koorneef, M.; Leon-Kloosterziel, K. M.; Schuwartz, S.H. y Zeevaart, J.A.D. (1998). The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry*. 36: 83-89.
- Leube, M. Grill, E. y Amrhein, N. (1998). *ABI1* of *Arabidopsis* is a protein serine/threonine phosphatase highly regulated by the proton and magnesium ion concentration. *FEBS Letters*. 424: 100-104.
- Leung, J., Merlot, S., Giraudat, J. (1997). The *Arabidopsis* ABSCISIC ACID-INSENSITIVE (*ABI2*) and *ABI1* genes encode homologous protein phosphatases 2C involved in abscisic acid signal transduction. *Plant Cell*. 9: 759-771.
- Leung, J., Merlot, S., Gosti, F., Bertauche, N., Blatt, M. y Giraudat, J. (1998). The role of *ABI1* in abscisic acid transduction: from gene to cell. *Symposia of the Society for the Experimental Biology*. 51: 65-71.
- Leung, J. y Giraudat, J. (1998). Abscisic acid and signal transduction. *Annual Review Plant Physiology. Molecular Biology*. 49: 199-222.
- Liu, X., Yue, Y., Li, B., Nie, W., Li, W., Wu, W.H., Ma, L. (2007). A G-protein coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science*. 23;315 (5819): 1712-6.
- López-Molina, L.; Mongrand S. y Chua N.H. (2000). A postgermination developmental arrest checkpoint is mediated by abscisic acid and requires the *ABI5* transcription factor in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. 98: 4782-4787.
- López-Molina, L.; Mongrand S.; McLachlin D.T.; Chait B.T. y Chua N.H. (2002). *ABI5* acts downstream of *ABI3* to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant Journal*. 32: 317-328.
- Meinke, D.W.; Franzmann, L.H.; Nickle, T.C. y Yeung, E.C. (1994). *Leafy Cotyledon* mutants of *Arabidopsis*. *Plant cell*. 6:1049-1064.
- Merlot, S.; Gosti, F.; Guerrier, D.; Vavasseur, A. y Giraudat, J. (2001). The *ABI1* and *ABI2* protein phosphatases 2C act in a negative feedback regulatory loop of the abscisic acid signalling pathway. *Plant Journal*. 25(3): 295-303.
- Meyer, K., Leube, M.P. y Grill, E. (1994). A protein phosphatase 2C involved in ABA signal transduction in *Arabidopsis thaliana*. *Science*. 264: 1452-1455.
- Moreno, L. y Covarrubias, A. (2001). Downstream DNA sequences are required to modulate *Pvlea-18* gene expression in response to dehydration. *Plant Molecular Biology*. 45: 501-515.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plant*. 15: 473-497.
- Nambara, E. y Marion-Poll, A. (2003). ABA action and interactions in sedes. *Trends in Plant Science*. 8 (5): 213-217.

- Razem, F.A., El-Kereamy, Abrams, S.R., Hill, R.D. (2006). The RNA-chelataze binding protein FCA. *Nature*. **19**; 439 (7074):290-4.
- Ross, C. y Quatrano, R. (1994). Insensitivity is in the genes. *Current Biology*. **4**: 1013-1015.
- Rodríguez, P. (1998). Protein phosphatase 2C (PP2C) function in higher plants. *Plant Molecular Biology*. **38**: 919-927.
- Shen, Y.Y., Wang, X.F., Wu, F.Q., Du, S.Y., Cao, Z., Shang, Y., Wang, X.L., Peng., CC., Yu, X.C., Zhu, S.Y., Fan, R.C., Xu, Y.H., Zhang, D.P. (2006). The Mg-chelataze H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature*. **19**; 443 (7113): 823-6.
- Sheen, J. (1998). Mutational analysis of protein phosphatase 2C involved in abscisic acid signal transduction in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. **95**: 975-980.
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997). Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiology*. **115**: 327-334.
- Shinozaki, K. y 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.
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K., Seki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in drought and cold stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*. **6**: 410-417.
- Sigh, K., Foley, R. y Sanchez, L. (2002). Transcription factors in plant response. *Current Opinion in Plant Biology*. **5**:430-436.
- Skriver, K. y Mundy, J. (1990). Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell*. **2**: 503-512.
- Stone, S.L.; Kwong, L.W.; Yee, K.M.; Pelleiter, J.; Lepiniec, L.; Fischer R.L.; Goldberg, R.B. y Harda, J.J. (2001). *LEAFY COTYLEDON2* encodes B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*. **98**:11806-18011.
- Taiz, L. y Zeiger, E. (1991). *Plant Physiology*. The Benjamin/Cumming Publishing Company, Inc. 565 pp.
- To, A. y Valton C. (2006). A network of local and redundant gene regulation governs. *Arabidopsis* seed maturation. *Plant Cell*. **18**: 1642-1651.
- Umezawa, T.; Fujita, M.; Fujita, Y.; Yamaguchi-Shinosaki, K. y Shinozaki, K. (2006). Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring gens to unlock the future. *Current Opinion in Biotechnonology*. **17**:113-122.
- Vicient, C.M., Hull, G., Guillerminot, J., Devie, M. y Delseny, M. (2000). Differential expression of the *Arabidopsis* genes coding for Em-like proteins. *Journal of Experimental Botany*. **51** (348): 1211-1220.

- Xiong, L. y Zhu, J.K. (2003). Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology*. 133:29-36.
- Xiong, L. X.; Schumaker, K.S. y Zhu, J.K. (2002). Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plan Cell Supplement 2002*: S165-S183.
- Yamaguchi-Shinosaki, K. y Shinosaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stress. *Annual Review of Plant Biology*. 57:781-803.
- Zhu, J.K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review Plant Biology*. 53: 247-273.