

DESARROLLO TÉCNICO DE LA INVESTIGACIÓN

“Uso de la planta *Arabidopsis thaliana* para la identificación de genes con potencial biotecnológico involucrados en la respuesta y tolerancia a sequía, salinidad y frío.”

Director de Proyecto: Dr. Miguel Angel Villalobos López.

Participante: Dra. Analilia Arroyo Becerra.

Número de Registro SIP: 20062116

RESUMEN

La baja productividad agrícola de nuestro país se debe, entre otras cosas, a que más de dos tercios de nuestro territorio está constituido por zonas áridas o semiáridas caracterizadas por una escasa precipitación pluvial. De ahí que la sequía, el frío y la salinidad revistan una gran importancia para nuestras industrias alimenticia, ganadera y agrícola. Para contender con estos factores abióticos, las plantas disparan procesos de señalización molecular que tienden a reajustar su metabolismo a las nuevas condiciones ambientales. Algunas especies vegetales son capaces de tolerar niveles muy altos de estrés. Existe una especie conocida como la planta de la “resurrección” ya que puede permanecer por muchos años totalmente deshidratada y reverdecer unas cuantas horas después de recibir agua (*Craterostigma plantagineum*). Mediante la introducción en *Arabidopsis thaliana* de un factor transcripcional aislado de *Craterostigma* (*CpMYB10*), se reportó la obtención de plantas con mayores niveles de tolerancia a cambios fuertes del medioambiente que provocan un déficit hídrico (Villalobos et al., 2004, *Plant Physiology* 135:309-324); sin embargo los mecanismos moleculares que se vieron alterados al manipular la regulación génica de *Arabidopsis* no han sido estudiado a fondo. El interés principal de este trabajo fue el de identificar a las proteínas que se vieron alteradas en su expresión como resultado de la presencia de *CpMYB10*. El conocimiento que se obtuvo tiene un importante potencial biotecnológico ya que permitió la identificación de nuevos genes involucrados en la regulación por estrés abiótico y que podrán ser utilizados en un futuro para la obtención de plantas con mayor tolerancia al déficit hídrico.

INTRODUCCIÓN

Análisis de las respuestas adaptativas de las plantas ante la sequía

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

Las estrategias adaptativas que algunas plantas han desarrollado para contender con la sequía son: el “escape”, la “evasión” y la “tolerancia” a la sequía. El escape consiste en acortar el ciclo de vida de la planta de manera que coincida con la estación de lluvias, evitándose la sequía, y de esta manera no se expone a que disminuya el crecimiento, y consecuentemente, baje el rendimiento de la planta. En la evasión, la planta mantiene un estatus hídrico constante debido a las adaptaciones morfofisiológicas que presenta, tales como la ausencia de hojas y presencia de espinas, una cutícula cerosa, parénquima esponjoso, raíces de gran longitud; y el metabolismo del carbono tipo C4 ó CAM, como es el caso de los cactus y los agaves (Nilsen y Orcutt, 1996).

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

Ante la sequía, las plantas responden mediante modificaciones a su fisiología.

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

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

Cuando las plantas presentan estrés hídrico modifican la expresión de una batería importante de genes.

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

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

respuesta al estrés hídrico (Bartels *et al.*, 1990; Piatkowski *et al.*, 1990). Las características comunes de estas proteínas es que son altamente hidrofílicas, no contienen residuos de cisteína ni triptófano y son de bajo peso molecular. Existen algunas proteínas de *E. coli* y de levadura que también son altamente hidrofílicas y que se expresan en respuesta a estrés osmótico, y por ello se ha propuesto incluirlas junto con las LEAs dentro de un grupo de proteínas llamadas hidrofilinas (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). Se ha postulado en base a su estructura, que la función de las LEAs es osmoprotectora, probablemente ligada a la retención del agua citoplasmática, en la preservación de la estructura de las proteínas así como en el secuestro de iones durante la deshidratación, en la preservación de la estructura de la membrana o bien reemplazando a las moléculas de agua que se pierden durante la deshidratación. La regulación de los genes que codifican a las LEAs se lleva a cabo a nivel transcripcional, y se inducen en presencia de la hormona vegetal ácido abscísico (ABA) (Bray E.A., 1993; Ingram y Bartels, 1996).

***Craterostigma plantagineum* como modelo de estudio: una planta de “resurrección”.**

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

Los estudios con *Craterostigma* han mostrado que el estado fisiológico de la planta previo a la deshidratación es importante para la sobrevivencia. Estas plantas solo desarrollan

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

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

La hormona vegetal ABA regula la transducción de las señales desencadenadas por el estrés.

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

década de los 60's como un inhibidor que se acumula en frutos de algodón en abscisión ("abscisina II"), y también en hojas del árbol sicómoro con dormancia inducida por fotoperíodo ("dormina") (revisado en Filkestein y Rock, 2002).

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

A la fecha, todas las mutantes *aba* aisladas son pleiotrópicas (de hecho, solo una de cuatro mutantes *aba* fue identificada en un tamizado basado en ABA), y lamentablemente no se han identificado mutantes involucradas en el catabolismo o mutantes nulas en los genes de la biosíntesis de ABA (revisado en Finkelstein y Rock, 2002). Se piensa que el metabolismo de ABA se encuentra regulado por retroalimentación, ya que muchas mutantes *abi* (insensibles a ABA) presentan niveles alterados de ABA, mientras que algunos genes de la biosíntesis de ABA se encuentran regulados por esta hormona. Estas observaciones sugieren que los procesos involucrados en la homeostasis de ABA son muy complejos. La redundancia genética podría sumarse a esta complejidad, pero se conoce muy poco sobre la regulación del metabolismo de ABA, su especificidad de tejido, o su compartamentación subcelular. Existe evidencia sólida que sugiere que la manipulación de la biosíntesis y/o señalización de ABA

puede conferir adaptación al estrés en plantas transgénicas, y también que la homeostasis de ABA es parte de una compleja red hormonal que funciona integrando señales del medioambiente y los programas de desarrollo de la planta (Chory y Wu, 2001).

Debido a que el ABA es un sesquiterpenoide, durante mucho tiempo se pensó que se sintetizaba directamente a partir de farnesilfosfato, como ocurre en los hongos. Sin embargo, ahora sabemos que el ABA se sintetiza indirectamente a partir de carotenoides. El ABA ($C_{15}H_{20}O_4$) tiene un átomo de carbono asimétrico que es activo ópticamente (C-1'). La forma más común en la naturaleza es *S*-(+)-ABA; la cadena lateral de ABA es por definición 2-*cis*,-4-*trans*. La forma *trans-trans* de ABA es biológicamente inactiva. Debido a su naturaleza de ácido débil ($pK_a=4.8$), el ABA mayoritariamente se encuentra sin carga cuando está presente dentro del ambiente relativamente ácido del compartimiento apoplástico de las plantas, y puede entrar fácilmente a las células a través de la membrana plasmática. El concepto de captura de aniones se aplica para explicar la distribución del ABA entre los compartimentos celulares: la forma disociada (anión) de este ácido débil se acumula en compartimentos alcalinos (ej. cloroplastos iluminados) y se podría redistribuir de acuerdo a los niveles de los gradientes de pH a través de las membranas. Adicionalmente, podrían existir acarreadores específicos para mantener una baja concentración de ABA en el apoplasto en plantas sin estrés (revisado en Finkelstein y Rock, 2002).

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

De esta manera, una de las primeras respuestas de las plantas al déficit de agua es un rápido aumento en los niveles de ABA. En varias especies vegetales se han aislado mutantes deficientes en la síntesis de ABA (mutantes *aba*). La caracterización de estas mutantes, en conjunto a estudios bioquímicos, ha permitido que actualmente se conozca la ruta de biosíntesis de ABA y los genes involucrados (Schwartz *et al.*, 2003). La biosíntesis de ABA inicia dentro de los cloroplastos a partir de un precursor derivado de los carotenoides, la

zeaxantina, y termina en el citoplasma donde puede ser llevado a cabo su función o bien ser catabolizado (Cutler y Krochko, 1999; Schwartz *et al.*, 2003).

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

Factores transcripcionales involucrados en la respuesta a estrés medioambiental.

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

FTs tipo cierre de Leucina básico (b-ZIP). Los FTs tipo cierre de Leucina básico (b-ZIP) contienen un dominio de unión a DNA rico en residuos básicos que se encuentra adyacente a un dominio de dimerización tipo cierre de leucina. Varios TFs tipo b-ZIP se unen al elemento en *cis* conocido como ABRE (Elemento de Respuesta a ABA, c/tACGTggc) el cual se encuentra en muchos promotores que responden a deshidratación y/o a ABA. Entre estos se

encuentra EmBP1 de trigo, el cual transactiva al promotor del gen *Em* que codifica una LEA clase 1 (Guiltinan *et al.*, 1990). También se han identificado b-ZIPs cuyos productos se unen a ABRE en tabaco (*TAF1*) y en arroz (*OSBZ8*, *OsZIP-1a*, *TRAB1*) (Oeda *et al.*, 1991; Nakagawa *et al.*, 1996; Nantel y Quatrano, 1996; Hobo *et al.*, 1999). Se ha demostrado que *TRAB1* interacciona *in vivo* con el TF *OsVP1* para juntos poder transactivar el promotor de *OsEm* (Hobo *et al.*, 1999).

De igual manera, en *Arabidopsis* se identificó una familia de b-ZIPs que se unen a elementos ABRE (*ABF2*, *ABF3* y *ABF4*) y que además participan en la señalización de estrés osmótico (Choi *et al.*, 2000). De manera independiente, Uno y colaboradores (2000) también aislaron dos clonas de cDNA que codifican para b-ZIPs con capacidad de unirse a ABRE (*AREB1* y *AREB2*) y cuya transcripción es regulada positivamente por sequía, NaCl y ABA. Tanto *AREB1* y *AREB2* activan la transcripción de un gen reportero manejado por ABRE y requieren de ABA para activarse. Por último, utilizando la estrategia de clonación posicional en la mutante *abi5*, Finkelstein y Lynch (2000) reportan que *ABI5* codifica para un FT tipo b-ZIP regulado por ABA; Lopez-Molina y colaboradores (2002) demuestran que *ABI5* actúa debajo de *ABI3* en la vía de ABA, y además presenta evidencia de que *ABI5* regula a los genes *AtEm1* y *AtEm6*. Lo anteriormente expuesto coincide con los resultados obtenidos por Bensmihen y colaboradores (2004), donde confirman la regulación de *ABI5* sobre *AtEm1* al cruzar dos líneas de plantas transgénicas, una que sobreexpresa *ABI5* y otra que porta el promotor *AtEm1* fusionado al gen reportero GUS.

FTs tipo B3. Este tipo de FTs se caracterizan por la presencia de un dominio de 120 aminoácidos conservados presente en la región carboxilo conocido como dominio B3 (Liu *et al.*, 1998). *VP1* de maíz es un co-activador de varios genes específicos de semilla que son regulados por ABA (McCarty *et al.*, 1991; Vasil *et al.*, 1995), y esta co-activación depende fuertemente de ABA (Carson *et al.*, 1997; Vasil *et al.*, 1995). El TF *VP1* contiene cuatro dominios conservados que se denominan A1, B1, B2, y B3 (Giraudat *et al.*, 1992). La proteína *VP1* completa no puede unirse a DNA (en estudios *in vitro*), sin embargo el dominio B3, por sí solo, tiene la capacidad de unirse de manera específica al elemento *cis* conocido como Sph (Suzuki *et al.*, 1997). Por otro lado, el gen *VP1* codifica para una proteína que junto con ABA es capaz de transactivar a los genes *c1* y *Em* durante la maduración de la semilla de maíz

(McCarty *et al.*, 1991), aunque no se ha demostrado una interacción directa entre VP1 y el promotor *Em*. Para el caso del promotor *c1*, se ha demostrado que un dominio (conocido como B3) de la proteína VP1 es esencial para la transactivación de este promotor, además de que este mismo dominio se une de manera específica a un elemento *cis* conocido como Sph que resulta esencial para la respuesta a ABA (Kao *et al.*, 1996., Suzuki *et al.*, 1997).

En Arabidopsis, el gen *ABI3*, al igual que su homólogo *VP1* de maíz, codifica para un FT que presenta una organización estructural singular para este tipo de proteínas (Giraudat *et al.*, 1992). En base a conservación de la secuencia de aminoácidos y en la similitud de los fenotipos de las mutantes, se considera que la proteína *ABI3* de Arabidopsis es un ortólogo de *VP1* (Suzuki *et al.*, 2001). *ABI3*, el cual fue identificado inicialmente como una mutante insensible a ABA (mutante *abi3*; Giraudat *et al.*, 1992), comparte funciones complementarias con *VP1* de maíz, ya que la expresión ectópica de *VP1* en el fondo genético de *abi3* puede restaurar la sensibilidad a ABA y suprimir el fenotipo de floración temprana que exhiben las mutantes *abi3* (Suzuki *et al.*, 2001). Las mismas plantas transgénicas fueron estudiadas por Suzuki y colaboradores (2003) utilizando microarreglos y comparando los datos al utilizar RNA de plantas *abi3*. En las plantas sobre-expresoras de *VP1* tratadas con ABA se observaron alteraciones en la expresión de cerca del 73% de los 7402 genes nucleares representados en el microarreglo. Muchos genes específicos de semilla presentan expresión constitutiva en tejidos vegetativos de las plantas transgénicas, lo cual respalda la coparticipación de *VP1* y *ABI3*. En las plantas transgénicas, se encuentra activado el regulador positivo de ABA *ABI5*, mientras que se encuentran inhibidos los reguladores negativos *ABI1* y *ABI2* (ambas PP2Cs), revelándose así dos ramificaciones de la vía. Por otro lado, dependiendo de los elementos *cis* presentes en sus promotores, los genes co-activados por ambos, *VP1* y ABA, caen en dos grupos: los que tienen ABREs y lo que poseen Sphs, mientras que los genes que solo son inducidos por ABA no tienen elementos Sphs. En otro trabajo, la expresión ectópica de *ABI3* reveló la importancia de este FT al mediar puntos importantes de las respuestas de Arabidopsis ante ABA y frío. Estas plantas transgénicas presentan niveles de transcrito mas altos de los genes *RAB18* y *LT178*, además de tener una mayor tolerancia a estrés por frío y una mayor sensibilidad a ABA (Tamminen *et al.*, 2001).

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

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

En el tejido vegetativo de *Arabidopsis* sometido tanto a estrés hídrico ó ABA, se reportó la inducción de la expresión de una proteína tipo HD-ZIP (*ATHB-7*) (Söderman *et al.*, 1996). A nivel transcripcional, *ATHB7* se encuentra en niveles basales en todos los órganos de la planta, pero su transcrito aumenta rápidamente en respuesta a ABA o deshidratación. En mutantes *aba* y *abi1*, la expresión de este gen disminuye drásticamente. Hoy en día, no se conocen aún los genes blancos de *ATHB-7*.

Otro miembro de esta familia regulado por deshidratación y ABA es *ATHB12*. Al comparar la cinética de expresión de *ATHB12* contra la de *ATHB7*, Lee y Chun (1998) encontraron algunas diferencias, lo cual sugiere que estos dos genes podrían estar siendo regulados de diferente manera en respuesta a ABA. A la fecha, no han sido reportados fenotipos de mutantes o líneas sobre-expresoras de *ATHB12*, lo cual limita el conocimiento de la importancia de este gen dentro de la vía.

Recientemente se identificó a *ATHB5* como otro miembro de esta familia HD-ZIP que se encuentra participando en la respuesta a ABA en plántulas en desarrollo de *Arabidopsis* (Johannesson *et al.*, 2003). La expresión de *ATHB5* es dependiente del estado de desarrollo, ya que aunque no se expresa en semillas secas, su expresión se induce desde las 12 hrs de inmersión en agua, y se mantiene en su punto más alto en plántulas de 1 día de germinación y va decreciendo paulatinamente al paso de los días hasta que al día 16 de germinación el nivel de transcrito de *ATHB5* es apenas 0.02% al compararse con el día 1. En estados de desarrollo

temprano (día 1), la expresión del gen reportero GUS regulado por el promotor *ATHB5* se restringe al hipocotilo, mientras que en estados de desarrollo posteriores (día 8) también se observa expresión de GUS en cotiledones y hojas en desarrollo. En experimentos tipo Northern, la expresión de *ATHB5* se ve disminuida cuando plantas de dos días son expuestas a ABA. En experimentos con GUS, el tratamiento con ABA provoca una redistribución de la expresión, ya que disminuye considerablemente la expresión en la parte apical del hipocotilo, mientras que prácticamente no se observa variación en la zona de transición. Una mutante *athb5* no presenta fenotipo, mientras que la sobre-expresión de *ATHB5* provoca una mayor sensibilidad a ABA medida como porcentaje de germinación en distintas concentraciones de ABA. En comparación con plantas de tipo silvestre, las líneas sobre-expresoras de *ATHB5* tratadas con ABA presentan un incremento de tres veces en la expresión del gen *RAB18* (Johannesson *et al.*, 2003).

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

FTs tipo ERF/AP2. En *Arabidopsis*, esta numerosa familia de FTs esta compuesta por 144 miembros (Riechman *et al.*, 1998; Sakuma *et al.*, 2002). Estas proteínas presentan un dominio de unión a DNA que había sido reportado anteriormente para la proteína APETALA2 de *Arabidopsis*, involucrada en el desarrollo floral, y es por esto que este tipo de dominio fue llamado originalmente AP2. A partir del trabajo de Riechman y colaboradores (1998) el nombre cambio por dominio ERF/AP2 en honor a los miembros mejor conocidos de este tipo de factores, que son APETALA2 y ERF1 (involucrado en la respuesta a etileno). Este dominio contiene un motivo de 68 aminoácidos repetidos 1 o 2 veces (dominio ERF/AP2) (Jofuku *et al.*, 1994). Dentro de cada dominio AP2 existen 2 bloques de secuencias conservadas. El primero bloque (elemento YGR) consiste de 19-22 aminoácidos, es altamente básico y contiene los aminoácidos conservados YGR. El segundo bloque conservado se conoce como elemento YADR, es de 42-43 aminoácidos y contiene una región central de 18 aa altamente

conservados; se ha predicho que esta región central del elemento YADR forma una α -hélice anfipática en los dominios AP2 (Okamuro *et al.*, 1997).

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

Otro importante miembro de este tipo de FTs es la proteína codificada por *ABI4*. Utilizando estrategias de clonación posicional, Finkelstein y colaboradores (1998) lograron la clonación del gen *ABI4* y encontraron que codifica para un FT del tipo ERF/AP2. Debido a que los fenotipos de la mutante *abi4* se observaban únicamente a nivel de semilla, fue

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

FTs tipo bHLH (antes MYC; “Myeloblast determination factor c-*Myc*”). Las proteínas de este tipo poseen un dominio básico de unión a DNA tipo “helix-loop-helix” (bHLH). El dominio bHLH está compuesto de dos subdominios: la región básica y la región HLH. El subdominio HLH es la región responsable para la dimerización de la proteína. En dos reportes recientes se han analizado a esta familia de FTs utilizando herramientas informáticas para hacer una clasificación detallada de ellas (Heim *et al.*, 2003; Toledo-Ortiz *et al.*, 2003). Sin embargo, existen algunas discrepancias y contradicciones al comparar los resultados obtenidos por ambos grupos. Algunos meses después, ambos equipos de investigación y algunas autoridades en el campo, se unieron para finalmente establecer una nueva clasificación y nomenclatura para este tipo de FTs (Bailey *et al.*, 2003). Este tipo de proteínas conforma una de las familias más abundantes de FTs en *Arabidopsis*, ya que se ha calculado que esta es compuesta por al menos 162 miembros (Bailey *et al.*, 2003). En *A. thaliana* se reportó la presencia de un gen tipo bHLH/MYC (*rd22BP1*) cuya expresión es inducida por sequía, salinidad y ABA. La proteína *rd22BP1* se une *in vitro* a un elemento en *cis* tipo MYC presente en el promotor del gen *rd22* y además, puede transactivar este promotor en experimentos realizados en protoplastos aislados a partir de hojas de *A. thaliana* (Abe *et al.*, 1997). Se ha

propuesto una interacción entre rd22BP1 y una proteína tipo MYB llamada AtMYB2 (Abe *et al.*, 1997; Abe *et al.*, 2003).

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

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

tres residuos de triptofano espaciados de manera regular cada 19 aminoácidos, aproximadamente. Estos residuos de triptofano forman un “cluster” de triptofanos dentro de la estructura tridimensional que ha sido determinada en varias proteínas MYB (Stracke *et al.*, 2001). Dependiendo de su posición, a los motivos en tandem antes mencionados se les denominan R1, R2 y R3. Curiosamente, en *Arabidopsis* se reportó la presencia de un gen MYB que posee cuatro repeticiones (Strake *et al.*, 2001). Por otro lado, el dominio de transactivación de los genes MYB no se conserva, pero siempre presenta un carácter ácido y puede estar sujeto a modificaciones postraduccionales como fosforilación (Thompson y Ramsay, 1995). Dependiendo del número de repeticiones adyacentes del dominio MYB (uno, dos o tres), a las proteínas tipo MYB se les puede clasificar en tres subfamilias: las que tienen solo un dominio MYB se conocen como factores MYB1R, las de dos dominios son los factores tipo R2R3, y finalmente las que poseen tres repeticiones del dominio MYB se conocen como factores MYB3R (Jin y Martin, 1999; Rosinski y Atchley, 1998; Strake *et al.*, 2001).

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

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

Muy poco se conoce sobre el papel de los genes MYB tipo R2R3 en la regulación de las respuestas a estrés osmótico. En un esfuerzo por conocer la regulación de los genes MYB de

Arabidopsis, Kranz y colaboradores (1998) utilizaron “Northern reversos” sobre un macroarreglo de genes MYBs que contenía 91 cDNAs que representan casi el 73% de los 125 miembros de la familia R2R3 de Arabidopsis (Reichmann y Ratcliffe, 2000; Strake *et al.*, 2001). Entre las más de 20 condiciones de crecimiento analizadas, Kranz y colaboradores (1998) utilizaron plantas tratadas con ABA, ó bien plantas sometidas a deshidratación. Muy pocos genes MYB fueron inducidos con estos tratamientos. Sin embargo, los que mejor responden a ABA fueron: *AtMYB1*, *AtMYB2*, *AtMYB3*, *AtMYB7*, *AtMYB13*, *AtMYB38*, *AtMYB44*, *AtMYB73*, y *AtMYB74*. Por otro lado, en respuesta a sequía se induce la transcripción de los genes *AtMYB1*, *AtMYB2*, *AtMYB3*, *AtMYB4*, *AtMYB6*, *AtMYB7*, *AtMYB13*, *AtMYB29*, *AtMYB32*, *AtMYB34*, *AtMYB44*, *AtMYB59*, *AtMYB74*, *AtMYB75*, *AtMYB77*, *AtMYB90*, *AtMYB91*, *AtMYB94*, y *AtMYB102* (Kranz *et al.*, 1998). A raíz de estos datos, es evidente que existe un buen número de genes MYB regulados por estrés hídrico y ABA, lo cual indica que este tipo de FTs pudiera estar participando de manera importante en la regulación del estrés abiótico.

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

Además, AtMYB2 se une a dos sitios *cis* tipo MYB presentes en el promotor del gen *ADH1* (alcohol deshidrogenasa), un gen cuyo transcrito también se acumula en respuesta a estrés por bajo oxígeno, sequía y ABA. Utilizando la sobre-expresión de *AtMYB2* y el promotor de *ADH1* de *Arabidopsis* fusionado a GUS en ensayos de transactivación, se observó que AtMYB2 es capaz de transactivar el promotor de *ADH1*, tanto en protoplastos de *Arabidopsis* y tabaco, así como también en experimentos de bombardeo de partículas sobre hojas de chícharo (Hoeren *et al.*, 1988), lo cual indica que AtMYB2 juega un papel en la regulación de *ADH1* ante el estrés abiótico.

Con base en este marco teórico, *el objetivo fundamental* del presente proyecto fue el identificar genes con potencial biotecnológico involucrados en la respuesta y tolerancia a sequía, salinidad y frío, mediante el análisis del proteoma de una línea representativa que sobreexpresa un factor transcripcional heterólogo, capaz de conferir resistencia a dichos tipos de estrés abiótico.

MATERIALES Y METODOS

El diseño experimental utilizado en la investigación se describe a continuación:

Material Biológico

Se obtuvieron líneas de plantas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan el factor transcripcional *CpMYB10* aislado de *Craterostigma plantagineum* previamente reportadas en Villalobos *et al.*, (2004). Como control se utilizó una línea transgénica que fue transformada únicamente con el vector *pBin35S-NOS*.

Tratamientos de las plantas con ABA

Dado que la fitohormona ABA es la hormona considerada por excelencia como la hormona del estrés hídrico, se llevaron a cabo tratamientos con dicha molécula vegetal. Para ello, se utilizaron plántulas de 15 d crecidas *in vitro* las cuales fueron tratadas con ABA 100 μ M por 16 hr, ó sin tratamiento (como control o testigo) bajo las condiciones descritas previamente (Villalobos *et al.*, 2004).

Extracción de proteínas totales de Arabidopsis

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

Separación de las proteínas por Punto Isoeléctrico.

Para el isoelectroenfoque de las proteínas (1DE, primera dimensión de separación), se utilizaron tirillas “Immobiline DryStrip” (Amersham Biosciences) con rangos de 3-10 ó 4-7 de PI en el formato de 18 cm. Se utilizaron 100 μg del extracto proteico diluido a 200 μl de volumen final con buffer de rehidratación complementado con 0.5% de buffer IPG (dependiendo del rango de PI deseado se utilizaron los búferes IPG3-10L ó IPG4-7). Esta solución diluida de proteínas fue utilizada para rehidratar las tirillas de inmobilinas dentro de “sarcófagos” de porcelana con electrodos en los extremos, y para el isoelectroenfoque se utilizó el sistema IPGPHOR de Amersham bajo las siguientes condiciones:

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

Separación de las proteínas por Peso Molecular (2DE)

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

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

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

Identificación molecular de las proteínas de interés

Para la identificación de las proteínas se utilizó un espectrómetro de masas tipo MALDI-ToF (“matrix assisted laser desorption ionization-time of flight”) modelo REFLEX IV de la marca Bruker-Daltonics. Después de analizar los geles de doble dimensión, se procedió a seleccionar y recortar las proteínas de interés manualmente. Los pedazos de gel (1-2 mm de diámetro) fueron depositados en placas con formato de 96 pozos para su procesamiento. Dichos fragmentos de gel (cada uno conteniendo una proteína de interés) fueron desteñidos, reducidos, alquilados, y digeridos con tripsina (Promega), para posteriormente extraer los péptidos, siguiendo las recomendaciones de Kinter y Sherman (2000). Para favorecer su cristalización, los péptidos resultantes de cada digestión fueron mezclados con la matriz conocida como ácido *a*-ciano-4-hidroxicinámico (Aldrich), y las alícuotas de cada digestión fueron dispensadas en pequeñas cantidades (2-4 μ l) sobre las placas del MALDI con formato de 384 pozos. Las placas del MALDI que contenían las muestras fueron introducidas al equipo, y cada muestra fue sometida al menos a 25 bombardeos de láser. Para la identificación de las proteínas, los espectros de masas resultantes del análisis fueron comparados con la base de datos de digestiones teóricas de proteomas del NCBI (MASCOT). Es importante mencionar, que la identificación de las proteínas fue realizada en el laboratorio del Dr. Juan Antonio López del Olmo (CNB Madrid España) ya que él cuenta con el equipo requerido para ello. Además, esta es la primera parte de una colaboración que el Dr. Del olmo y un servidor planeamos llevar en un futuro cercano.

Soluciones:

Búfer de Lisis:

Urea	8.4 M
Tiourea	2.4 M

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

*Añadir al momento de usar

Búfer de Rehidratación:

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

* Añadir en el momento de usar

** pH dependiente de la tirilla a usar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de identificar proteínas expresadas diferencialmente en respuesta a CpMYB10, se realizaron geles bidimensionales de los proteomas de la línea transgénica 11.5 que sobreexpresa *CpMYB10* bajo la regulación del promotor constitutivo *35S*, así como también de una línea transgénica control que fue transformada únicamente con el vector *pBin35S-NOS*. Se utilizaron plántulas de 15 d tratadas con ABA 100 μ M por 16 hr, ó sin tratamiento. Como se puede apreciar en la Fig. 1, la gran mayoría de las proteínas de Arabidopsis se concentran en la zona ácida de pI.

Para realizar un mejor análisis de esta zona, en lo subsiguiente se utilizaron geles bidimensionales enfocados únicamente en esta fracción (Fig. 2). Se encontraron varias proteínas expresadas diferencialmente en respuesta a ABA entre estos dos tipos de plantas, y 11 de ellas fueron identificadas mediante espectrometría de masas utilizando un equipo tipo MALDI-ToF (“Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight”). Algunas de estas proteínas muestran una clara relación con respuestas a estrés medioambiental, tales como:

una proteasa dependiente de ATP, el factor transcripcional RAV2, la anhidrasa carbónica, la glutatión transferasa, una ascorbato reductasa dependiente de GSH, y la chaperonina HSP60 (Fig. 3).

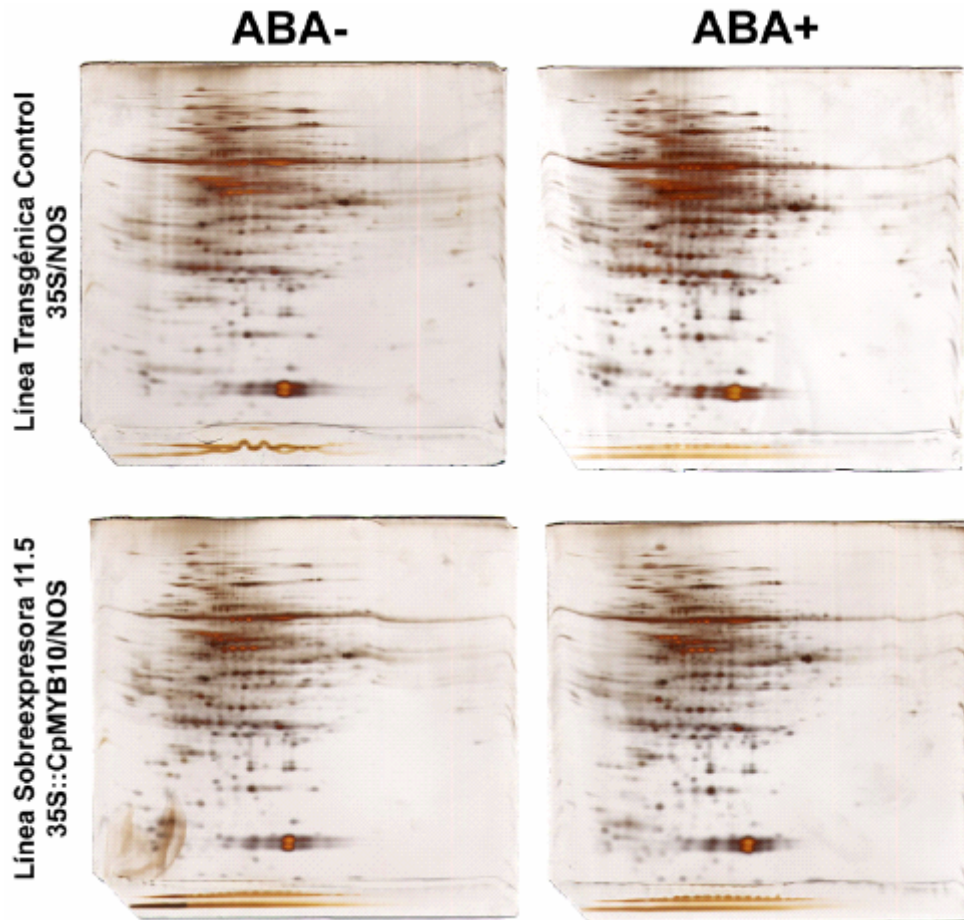


Fig. 1. Geles bidimensionales de los proteomas de la línea 11.5 que sobre-expresa *CpMYB10* bajo la regulación del promotor constitutivo 35S vs. una línea transgénica control que fue transformada únicamente con el vector *pBin35S-NOS*. Se utilizaron plántulas de 15 d tratadas con ABA 100 μ M por 16 hr, ó sin tratamiento. El punto Isoeléctrico analizado es amplio (3-10). La fracción de proteínas ácidas se encuentra al lado izquierdo de cada gel.

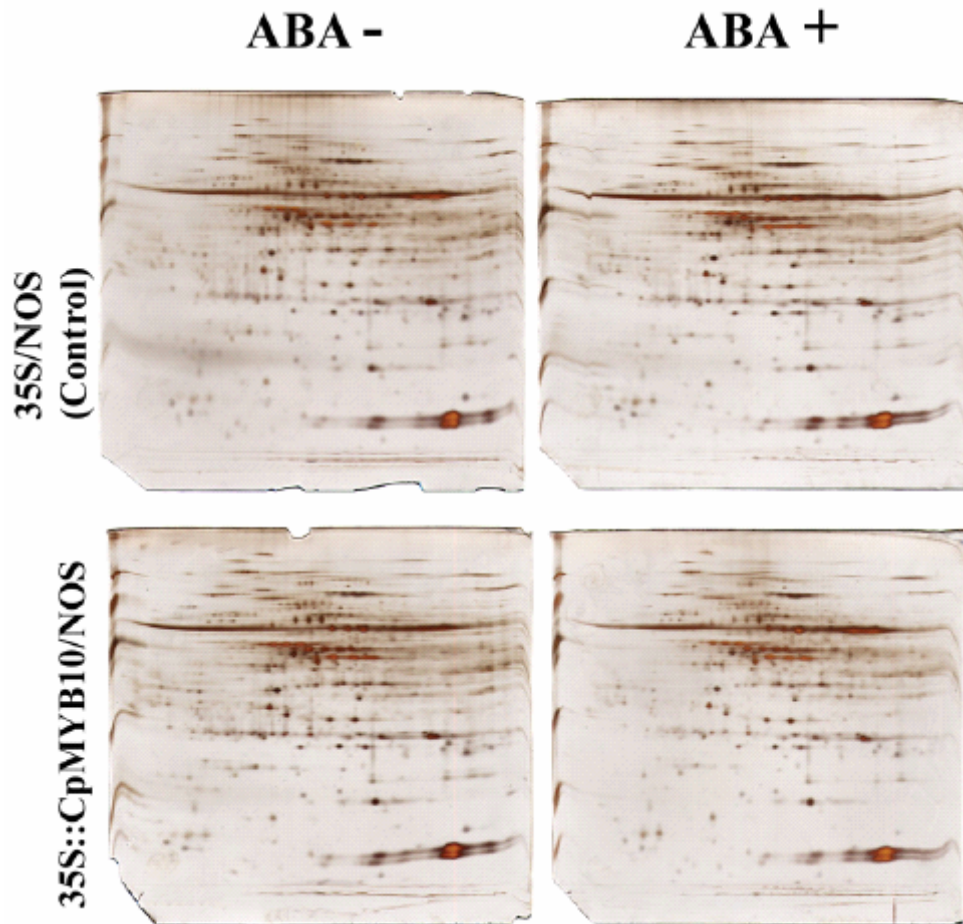


Fig. 2. Geles bidimensionales de los proteomas de la línea 11.5 que sobre-expresa *CpMYB10* bajo la regulación del promotor constitutivo *35S* vs. una línea transgénica control que fue transformada únicamente con el vector *pBin35S-NOS*. Se utilizaron plántulas de 15 d tratadas con ABA 100 μ M por 16 hr, ó sin tratamiento. El punto isoelectrico analizado es amplio (4-7). La fracción de proteínas más ácidas se encuentra al lado izquierdo de cada gel.

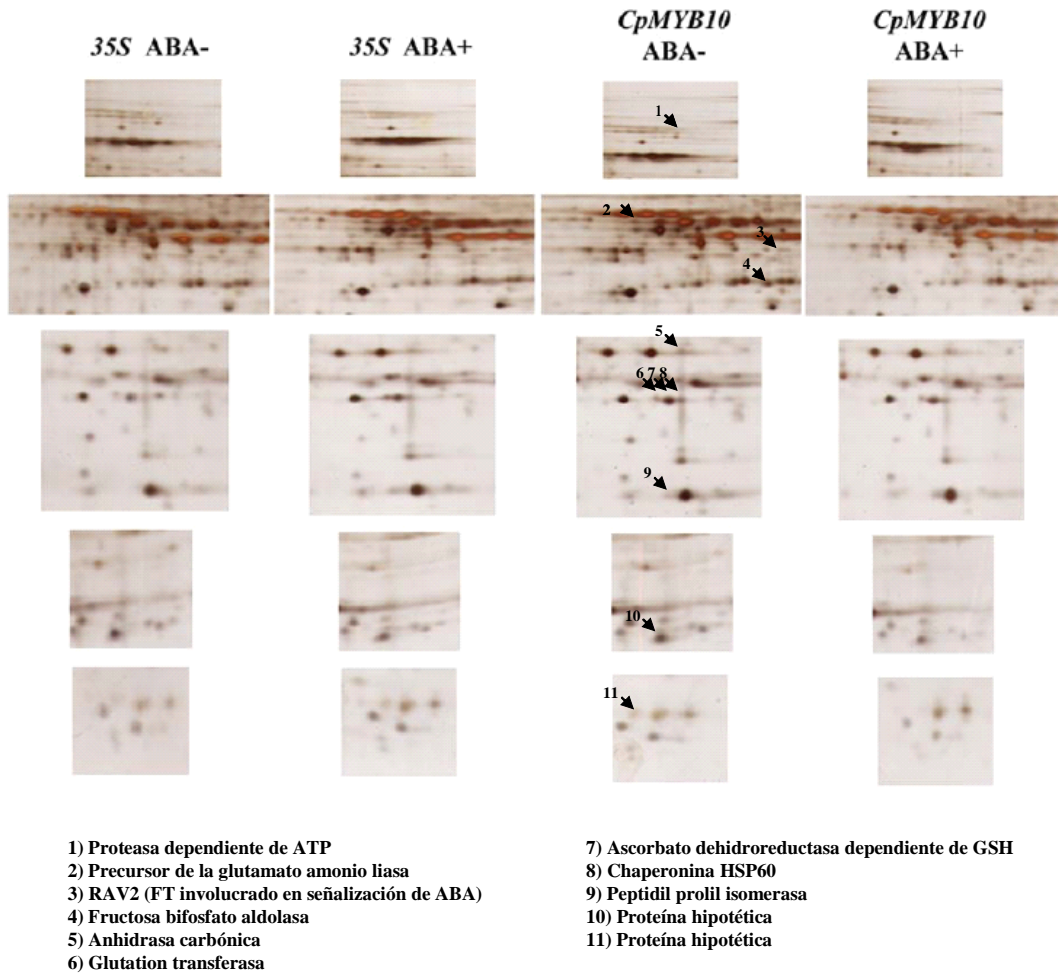


Fig. 3. Proteínas expresadas diferencialmente en respuesta a ABA entre las plantas 35S-*CpMYB10* vs. las plantas control. Se muestran ampliaciones de ciertas regiones de los geles presentados en la Fig. 21. Algunas de estas proteínas fueron identificadas por espectrometría de masas utilizando un equipo tipo MALDI-ToF (“Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight”), y se muestran en la parte baja de la figura.

Es probable que se puedan detectar otras proteínas bajo otras condiciones de tratamiento. Además, se sabe que el uso de electroforesis bidimensional solo permite la visualización de

proteínas con altos niveles de expresión, lo cual deja abierta la posibilidad de que otras proteínas de baja expresión no hayan sido detectadas en nuestros análisis. Sin embargo, es interesante que sin tratamiento con ABA las plantas sobreexpresoras de *CpMYB10* (*35S-CpMYB10*) presenten algunas proteínas que solo aparecen en las plantas control (*35S-NOS*) en respuesta a ABA (RAV2, anhidrasa carbónica, chaperonina HSP60, y peptidil prolil isomerasa). Esto sugiere que bajo condiciones normales de crecimiento, la sobre-expresión de *CpMYB10* induce la expresión de algunas proteínas de respuesta a estrés en las plantas transgénicas. Es probable que aún en condiciones no estresantes, la sobreexpresión de *CpMYB10* este provocando que se encienda parte de la vía de señalización en respuesta a estrés.

El gen que codifica para la isopeptidil prolil isomerasa identificada en este trabajo (*ROC4/pCyPB*), fue previamente reportado como un gen de respuesta a estrés por calor (Luan *et al.*, 1994; Lippuner *et al.*, 1994). Se ha propuesto que las isopeptidil prolil isomerasas facilitan el plegamiento de ciertas proteínas (He *et al.*, 2004). Por otro lado, la chaperonina HSP60 participa en el plegamiento de proteínas que son importadas a la mitocondria, además de participar en la tolerancia a la hipertermia (Feder y Hofmann, 1999; Hill y Hemmingsen, 2001). Por otro lado, cuando las plantas de *Arabidopsis* son tratadas con una combinación simultánea de choque térmico y sequía, y analizadas mediante microarreglos, se observa una combinación parcial de respuestas a ambos estímulos (Rizhsky *et al.*, 2004). El gen que codifica para la HSP60 es uno de los 454 genes altamente inducidos que Rizhsky y colaboradores (2004) identificaron al combinar ambos estímulos. Estos datos sugieren que es probable que *CpMYB10* también se encuentre mediando las respuestas de las plantas al estrés por calor, por lo que sería muy interesante la realización de un análisis experimental mas detallado para confirmarlo.

Es posible que la sobre-expresión de *CpMYB10* altere la regulación de genes de respuesta a estrés oxidativo. La fructosa bifosfato aldolasa, es una enzima clave del ciclo de Calvin, consiste de una serie de reacciones enzimáticas reguladas fotosintéticamente y esta encargado de la reducción de bióxido de carbono a gliceraldehido-3-fosfato (Nilsen y Orcutt, 1996). Se reportó que la actividad de esta enzima aumenta de manera significativa en respuesta frío (Hurry *et al.*, 2000). En un reporte muy reciente se encontró a la fructosa bifosfato aldolasa asociada a tioredoxina (Yamazaki *et al.*, 2004), la cual es un componente de un complejo de

respuesta a estrés oxidativo. Otras proteínas de respuesta a estrés oxidativo que en las plantas sobre-expresoras de CpMYB10 presentan alteraciones en su expresión son: una anhidrasa carbónica, la glutatión transferasa, y la ascorbato dehidroreductasa dependiente de GSH. Las especies reactivas de oxígeno, además de ser tóxicas para las células, también funcionan como moléculas señalizadoras que controlan procesos tales como muerte celular programada, defensa contra patógenos, y respuestas a estrés abiótico (revisado en Mittler, 2002; Arora *et al.*, 2002). Así, los datos obtenidos sugieren que CpMYB10 participa de alguna manera en la señalización de estrés oxidativo en las plantas transgénicas de *Arabidopsis* que lo sobre-expresan.

IMPACTO

Los resultados de este proyecto abren la puerta a futuros análisis para ahondar con mayor profundidad hacia el conocimiento de la red reguladora en respuesta a estrés hídrico que se encuentra mediada por CpMYB10 en las líneas transgénicas descritas por Villalobos y colaboradores (2004). El hecho de que se haya identificado la regulación negativa o positiva de proteínas relacionadas con estrés hace que el futuro de esta línea de investigación sea muy prometedor. La estrategia seguida en el transcurso del proyecto fue de gran ayuda para la generación de nuevos proyectos que pensamos desarrollar en colaboración con el Dr. Juan Antonio López (CNB Madrid España).

Durante el transcurso del proyecto se incorporó una becaria PIFI, quien demostró gran entusiasmo durante su participación (Janet Morales Chávez).

BIBLIOGRAFIA.

Abe, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, T., Iwasaki, T., Hosokawa, D., & Shinozaki, K. (1997). Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9: 1859-1868.

Abe, H., Urao, T., Ito, T., Seki, M., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki K. (2003). *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling. *Plant Cell* 15: 63-78.

Arenas Huertero, F., Arroyo, A., Zhou, L., Sheen, J., & León, P. (2000). Analysis of *Arabidopsis* glucose insensitive mutants, gin5 and gin6, reveals a central role of the plant hormone ABA in the regulation of plant vegetative development by sugar. *Genes and Development* 14: 2085-2096.

Arora, A., Sairam, K., & Srivastava, G.C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. *Current Science* 82: 1227-1238.

Arroyo, A., Bossi, F., Finkelstein, R.R., & León, P. (2003). Three genes that affect sugar sensing (Abscisic Acid Insensitive 4, Abscisic acid Insensitive 5, and Constitutive Triple Response 1) are differentially regulated by glucose in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133: 231-242.

- Bailey, P.C., Martin, C., Toledo-Ortiz, G., Quail, P.H., Huq, E., Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., & Weisshaar B. (2003). Update on the Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor Gene Family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 15: 2497-2502.
- Baker, S.S., Wilhelm, K.S., & Thomashow, M.F. (1994). The 5' region of *Arabidopsis thaliana* cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Molecular Biology* 24: 701-713.
- Bartels, D., Schneider, K., Terstappen, G., Piatkowski, D., & Salamini, F. (1990). Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Planta* 181: 27-34.
- Bartels, D. & Salamini, F. (2001). Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Plant Physiology* 127: 1346-1353.
- Bensmihen, S., To, A., Lambert, G., Kroj, T., Giraudat, J. & Parcy, F. (2004). Analysis of an activated ABI5 allele using a new selection method for transgenic *Arabidopsis* seeds. *FEBS Letters*, 561: 127-131.
- Bohnert, H.J., Nelson, D.E., & Jensen, R.G. (1995). Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell* 7: 1099-1111.
- Boyer, J.S. (1982). Plant productivity and environment. *Science* 218: 443-448.
- Bray, E.A. (1993). Molecular responses to water deficit. *Plant Physiology* 103: 1035-1040.
- Bray, E.A., Bailey-Serres, J., & Weretilnyk, E. (2000). Responses to abiotic stresses. En: "Biochemistry and Molecular Biology of Plants". Gruissem, W., Buchanan, B., Jones, R. (eds). American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD; 1158-1249.
- Carson, C., Hattori, T., Rosenkrans, L., Vasil, V., Vasil, I.K., Peterson, P.A., & McCarty, D.R. (1997). The quiescent/colorless alleles of *viviparous1* show that the conserved B3 domain of VP1 is not essential for ABA-regulated gene expression in the seed. *Plant Journal* 12: 1231-1240.
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, D., Lee, B.-h., Hong, X., Agarwal, M., & Zhu, J.K. (2003). ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 17: 1043-1054.
- Choi, H., Hong, J., Ha, J., Kang, J. & Kim, S. (2000). ABFs: a family of ABA-responsive element binding factors. *Journal of Biological Chemistry* 275: 1723-1730.
- Chory, J., & Wu, D. (2001). Weaving the complex web of signal transduction. *Plant Physiology* 125: 77-80.
- Cutler, A. & Krochko, J. (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science* 4: 472-478.
- Dias, A.P., Braun, E.L., McMullen, M.D., & Grotewold, E. (2003). Recently duplicated maize R2R3 Myb genes provide evidence for distinct mechanisms of evolutionary divergence after duplication. *Plant Physiology* 131: 610-620.
- Feder, M.E., & Hofmann, G.E. (1999). Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annual review in Physiology* 61: 243-282
- Finkelstein, R.R., Wang, M.L., Lynch, T.J., Rao, S., & Goodman, H.M. (1998). The *Arabidopsis* abscisic acid response locus ABI4 encodes an APETALA2 domain protein. *Plant Cell* 10: 1043-1054.
- Finkelstein, R. & Lynch, T. (2000). The *Arabidopsis* abscisic acid response gene ABI5 encodes a basic leucine zipper transcription factor. *Plant Cell* 12: 599-609.
- Finkelstein, R.R., Gampala, S.S.L., & Rock, C.D. (2002). Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14 (Supplement): S15-S45.
- Finkelstein, R.R., & Rock, C.D. (2002). Abscisic acid biosynthesis and response. En: "The *Arabidopsis* Book". Somerville, C.R. and Meyerowitz, E.M., eds (American Society of Plant Biologist, Rockville, M.D. doi/10.1199/tab.0058, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis>).
- Frank, W., Phillips, J., Salamini, F., & Bartels, D. (1998). Two dehydration-inducible transcripts from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* encode interacting homeodomain-leucine zipper proteins. *Plant Journal* 15: 413-421.
- Furini, A., Koncz, C., Salamini, F., & Bartels, D. (1994). Agrobacterium-mediated transformation of the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum*. *Plant Cell Reports* 14:102-106.
- Gaff, D.F. (1971). Desiccation-tolerant flowering plants in Southern Africa. *Science* 174: 1033-1034.
- Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J.M., Garcarrubio, A., & Covarrubias, A. (2000). Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry* 275: 5668-5674.
- Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Stockinger, E.J., Salazar, M.P., Houghton, J.M., & Thomashow, M.F. (1998). Low-temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *Plant Journal* 16: 433-443.

- Gilmour, S.J., Sebolt, A.M., Salazar, M.P., Everard, J.D., Thomashow, M.F. (2000). Overexpression of the Arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation. *Plant Physiology* 124: 1854-1865.
- Giraudat, J., Hauge, B.M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F., & Goodman, H.M. (1992). Isolation of the Arabidopsis ABI3 gene by positional cloning. *Plant Cell* 4: 1251-1261.
- Giraudat, J., Parcy, F., Bertauche, N., Gosti, F., Leung, J., Morris, P.C., Bouvier-Durant, M., & Vartanian N. (1994). Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Molecular Biology* 26: 1557-1577.
- Giraudat, J. (1995). Abscisic acid signalling. *Current Opinion in Cell Biology* 7: 232-238.
- Goff, S.A., Cone, K.C., & Chandler V.L. (1992). Functional analysis of the transcriptional activator encoded by the maize B gene: evidence for a direct functional interaction between two classes of regulatory proteins. *Genes & Development* 6: 864-875.
- Grotewold, E., Drummond, B.J., Bowen, B., & Peterson, T. (1994). The Myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subset. *Cell* 76: 543-553.
- Guiltinan, M., Marcotte, Jr. W., & Quantrano, R.S. (1990). A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* 250: 267-271.
- He, Z., Legong, L., & Luan, S. (2004). Immunophilins and parvulins. Superfamily of peptidyl prolyl isomerases in Arabidopsis. *Plant Physiology* 134: 1248-1267
- Heim, M.A., Jakoby, M., Werber, M., Martin, C., Weisshaar, B., & Bailey, P.C. (2003). The basic helix-loop-helix transcription factor family in Plants: a genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular Biology and Evolution* 20: 735-747.
- Hill, J.E., & Hemmingsen, S.M. (2001). *Arabidopsis thaliana* type I and II chaperonins. *Cell Stress and Chaperones* 6: 190-200.
- Hobo, T., Kowyama, Y. & Hattori, T. (1999). A bZIP factor, TRAB1, interacts with VP1 and mediates abscisic acid-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96: 15348-15353.
- Hoeren, F.U., Dolferus, R., Wu, Y., Peacock, W.J., & Dennis E.S. (1998). Evidence for a role for AtMYB2 in the induction of the Arabidopsis alcohol dehydrogenase gene (ADH1) by low oxygen. *Genetics* 149: 479-490.
- Hurry, V., Strand, A., Furbank, R., & Stitt, M. (2000). The role of inorganic phosphate in the development of freezing tolerance and the acclimatization of photosynthesis to low temperature is revealed by the *pho* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 24: 383-396.
- Ingram, J. & Bartels, D. (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review in Plant Physiology & Plant Molecular Biology* 47: 377-403.
- Iturriaga, G., Leyns, L., Villegas, A., Gharaibeh, R., Salamini, F., & Bartels, D. (1996). A family of novel myb-related genes from the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* are specifically expressed in callus and roots in response to ABA or desiccation. *Plant Molecular Biology* 32: 707-716.
- Jaglo-Ottosen, K.R., Gilmour, S.J., Zarka, D.G., Schabenberger, O., & Thomashow, M.F. (1998). Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. *Science* 280: 104-106.
- Jiang, C., Gu, J., Chopra, S., Gu, X., & Peterson T. (2004). Ordered origin of the typical two- and three-repeat Myb genes. *Gene* 326: 13-22.
- Jin, H., & Martin, C. (1999). Multifunctionality and diversity within the plant MYB-gene family. *Plant Molecular Biology*. 41: 577-585.
- Jofuku, K.D., den Boer, B.G., Van Montagu, M., & Okamoto, J.K. (1994). Control of Arabidopsis flower and seed development by the homeotic gene APETALA2. *Plant Cell* 6: 1211-1225.
- Johannesson, H., Wang, Y., Hanson, J., & Engström, P. (2003). The Arabidopsis thaliana homeobox gene ATHB5 is a potential regulator of abscisic acid responsiveness in developing seedlings. *Plant Molecular Biology* 51: 719-729.
- Kao, C.Y., Cocciolone, S.M., Vasil, I.K., & McCarty, D.R. (1996). Localization and interaction of the cis-acting elements for abscisic acid, VIVIPAROUS 1, and light activation of the C1 gene of maize. *Plant Cell* 8: 1171-1179.
- Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnology* 17: 287-291
- Klempnauer, K.H., Gonda, T.J., & Bishop, J.M. (1982). Nucleotide sequence of the retroviral leukemia gene v-myb and its cellular progenitor c-myb: the architecture of a transduced oncogene. *Cell* 31: 453-463.

- Kranz, H.D., Denekamp, M., Greco, R., Jin, H., Leyva, A., Meissner, R.C., Petroni, K., Urzainqui, A., Bevan, M., Martin, C., Smeekens, S., Tonelli, C., Paz-Ares, J., & Weisshaar, B. (1998). Towards functional characterisation of the members of the R2R3-MYB gene family from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16: 263-276.
- Lee, Y.-H., & Chun, J.-Y. (1998). A new homeodomain-leucine zipper gene from *Arabidopsis thaliana* induced by water stress and abscisic acid treatment. *Plant Molecular Biology* 37: 377-384.
- Leung, J., & Giraudat, J. (1998). Abscisic acid signal transduction. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 199-222.
- Lipsick, J.S. (1996). One billion years of Myb. *Oncogene* 13: 223-235.
- Lippuner, V., Chou, I.T., Scott, S.V., Ettinger, W., Theg, S.M., & Gasser, C.S. (1994). Cloning and characterization of chloroplast and cytosolic forms of cyclophilin from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 269: 7863-7868.
- Liu, Q., Kasuga, M., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10: 1391-1406.
- Lopez-Molina, L., Mongrand, S., McLachlin, D., Chait, B.T. & Chua, N.H. (2002). ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant Journal* 32: 317-328.
- Luan, S., Lane, W.S., & Schreiber, S.L. (1994). pCyP B: a chloroplast-localized, heat shock-responsive cyclophilin from fava bean. *Plant Cell* 6: 885-892.
- MacRobbie, E.A.C. (1995a). Effects of ABA on 86Rb^+ fluxes at plasmalemma and tonoplast of stomatal guard cells. *Plant Journal* 7: 835-843.
- MacRobbie, E.A.C. (1995b). ABA induced ion efflux in stomatal guard cells: multiple actions of ABA inside and outside the cell. *Plant Journal* 7: 565-576.
- Martin, C., & Paz-Ares, J. (1997). MYB transcription factors in plants. *Trends in Genetics* 13: 67-73.
- McCarty, D.R., Hattori, T., Carson, C.B., Vasil, V., Lazar, M., & Vasil, I.K. (1991). The viviparous 1 developmental gene of maize encodes a novel transcription activator. *Cell* 66: 895-905.
- McCue, K.F. & Hanson, A.D. (1990). Drought and salt tolerance towards understanding and application. *Trends in Biotechnology* 8: 358-362.
- Medina, J., Bagues, M., Terol, J., Perez-Alonso, M., & Salinas, J. (1999). The *Arabidopsis* CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiology* 119: 463-470.
- Mitler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7: 405-410.
- Molina, J. (1979). "Recursos agrícolas de zonas áridas y semiáridas de México". Colegio de Postgraduados, Chapingo, México.
- Nakagawa, H., Ohmiya, K. & Hattori, T. (1996). A rice bZIP protein, designated OSBZ8, is rapidly induced by abscisic acid. *Plant Journal* 9: 217-227.
- Nantel, A. & Quatrano, R.S. (1996). Characterization of three basic leucine zipper factors, including two inhibitors of EmBP-1 DNA binding activity. *Journal of Biological Chemistry* 271: 31296-31305.
- Nilsen, E.T., & Orcutt, D.M. (1996). *The physiology of plants under stress*. John Wiley & Sons, INC., New York, NY, USA.
- Niu, X., Helentjaris, T., & Bate, N.J. (2002). Maize ABI4 binds coupling element1 in abscisic acid and sugar response genes. *Plant Cell* 14: 2565-2575.
- Novillo, F., Alonso, J.M., Ecker, J.R., & Salinas, J. (2004). CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 101: 3985-3990.
- Oeda, K., Salinas, J. & Chua, N.H. (1991). A tobacco bZIP transcription activator (TAF-1) binds to a G-box like motif conserved in plant genes. *EMBO Journal* 10: 1793-1802.
- Okamoto, J.K., Caster, B., Villarroel, V., Van Montagu, M., & Jofuku, K.D. (1997). The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 94: 7076-7081.
- Oppenheimer, D.G., Herman, P.L., Sivakumaran, S., Esch, J., & Marks, M.D. (1991). A myb gene required for leaf trichome differentiation in *Arabidopsis* is expressed in stipules. *Cell* 67: 483-493.

- Piatkowski, D., Schneider, K., Salamini, F., & Bartels, D. (1990). Characterization of five abscisic acid-responsive cDNA clones isolated from the desiccation-tolerant plant *Craterostigma plantagineum* and their relationship to other water-stressed genes. *Plant Physiology* 94: 1682-1688.
- Porembski, S. & Barthlott, W. (2000). Granitic and gneissic outcrops (inselbergs) as centers of diversity for desiccation-tolerant vascular plants. *Plant Ecology* 151: 19-28.
- Rabinowicz, P.D., Braun, E.L., Wolfe, A.D., Bowen, B., & Grotewold, E. (1999). Maize R2R3 Myb genes: sequence analysis reveals amplification in the higher plants. *Genetics* 153: 427-444.
- Riechmann, J.L., & Meyerowitz, E.M. (1998). The AP2/EREBP family of plant transcription factors. *Biological Chemistry* 379: 633-646.
- Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S., & Mittler, R. (2004). When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiology* 134: 1683-1696.
- Rosinski, J.A., & Atchler, W.R. (1998). Molecular evolution of the Myb family of transcription factors: evidence for polyphyletic origin. *Journal of Molecular Evolution* 46: 74-83.
- Sakuma, Y., Liu, Q., Dubouzet, J.G., Abe, H., Shinozaki, K., & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2002). DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration- and cold-inducible gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 290: 998-1009.
- Schwartz, S.H., Xiaoqiong, Q., & Zeevaert, J.A.D. (2003). Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiology* 131: 1591-1601.
- Söderman, E., Mattson, J., & Engström, P. (1996). The *Arabidopsis* homeobox gene *ATHB-7* is induced by water deficit and by abscisic acid. *Plant Journal* 10: 375-381.
- Söderman, E.M., Brocard, I.M., Lynch, T.J., & Finkelstein, R.R. (2000). Regulation and function of the *Arabidopsis* *ABA-insensitive4* gene in seed and abscisic acid response signaling networks. *Plant Physiology* 124: 1752-1765.
- Stockinger, E.J., Gilmour, S.J., & Thomashow, M.F. (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 94: 1035-1040.
- Stracke, R., Werber, M., & Weisshaar, B. (2001). The R2R3-MYB gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 447-456.
- Suzuki, M., Kao, C.Y., & McCarty, D.R. (1997). The conserved B3 domain of *VIVIPAROUS 1* has a cooperative DNA binding activity. *Plant Cell* 9: 799-807.
- Suzuki, M., Cao, C.-Y., Cocciolone, S., & McCarty, D.R. (2001). Maize *VP1* complements *Arabidopsis abi3* and confers a novel ABA/auxin interaction in roots. *Plant Journal* 28: 409-418.
- Suzuki, M., Ketterling, M.G., Li, Q.-B., & McCarty, D.R. (2003). *Viviparous1* alters global gene expression patterns through regulation of abscisic acid signaling. *Plant Physiology* 132: 1664-1677.
- Tamminen, I., Mäkelä, P., Heino, P., & Palva, E.T. (2001). Ectopic expression of *ABI3* gene enhances freezing tolerance in response to abscisic acid and low temperature in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 25: 1-8.
- Thompson, M.A. & Ramsay, R.G. (1995). Myb: an old oncoprotein with new roles. *BioEssays* 17: 341-350.
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., & Quail, P.H. (2003). The *Arabidopsis* basic/helix-loop-helix transcription factor family. *Plant Cell* 15: 1749-1770.
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. & Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000). *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 97: 11632-11637.
- Urao, T., Yamaguchi-Shinozaki, K., Urao, S., & Shinozaki, K. (1993). An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved Myb recognition sequence. *Plant Cell* 5: 1529-1539.
- Urao, T., Noji, M.-a., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1996). A transcriptional activation domain of *ATMYB2*, a drought-inducible *Arabidopsis* Myb-related protein. *Plant Journal* 10: 1145-1148.
- Vasil, V., Marcotte Jr, W.R., Rosenkrans, L., Cocciolone, S.M., Vasil, I.K., Quatrano, R.S., & McCarty, D.R. (1995). Overlap of *Viviparous1* (*VP1*) and Abscisic Acid Response Elements in the *Em* Promoter: G-Box Elements Are Sufficient but Not Necessary for *VP1* Transactivation. *Plant Cell* 7: 1511-1518.

Villalobos, M.A., Bartels, D., & Iturriaga, G. (2004). Stress tolerance and glucose insensitive phenotypes in *Arabidopsis* overexpressing the CpMYB10 transcription factor gene. *Plant Physiology* 135: 309-324.

Wood, A.J. & Oliver, M.J. (1999). Translational control in plant stress: the formation of messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) in response to desiccation of *Tortula ruralis* gametophytes. *Plant Journal* 18: 359-370.

Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K. (1994). A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *Plant Cell* 6: 251-264.

Yamazaki, D., Motohashi, K., Kasama, T., Hara, Y., & Hisabori, T. (2004). Target proteins of the cytosolic thioredoxins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology* 45: 18-27

Yu, E.Y., Kim, S.E., Kim, J.H., Ko, J.H., Cho, M.H., & Chung, I.K. (2000). Sequence-specific DNA recognition by the Myb-like domain of plant telomeric protein RTBP1. *Journal of Biological Chemistry* 275: 24208-24214.

Zeevaert, J.A.D. & Creelman, R.A. (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molecular Biology* 39: 439-473.