

Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión

Plant responses to water deficit stress. A review

Liz Patricia Moreno F.¹

RESUMEN

Siendo el agua uno de los factores más importantes para el desarrollo de las plantas, su carencia constituye una de las principales fuentes de estrés. Muchas plantas han desarrollado respuestas que les permiten tolerar diferentes niveles de déficit de agua, que van desde un estrés hídrico leve, causado por la disminución del potencial hídrico al mediodía, hasta aquellas que les permiten sobrevivir en hábitat desérticos. En este artículo se revisan las diferentes respuestas a nivel morfológico, anatómico, celular y molecular que permiten a las plantas tolerar y adaptarse al estrés por déficit hídrico. Estas respuestas incluyen modificaciones en el crecimiento, el desarrollo del metabolismo C4 y CAM, cierre de estomas y cambios en la expresión de genes, incluyendo los que codifican proteínas potencialmente protectoras, enzimas clave en la vía de síntesis de osmolitos, enzimas antioxidantes y factores de transcripción, que regulan la expresión de genes inducida por el estrés. Además se describe cómo estas respuestas pueden darse a través de vías de señalización que pueden ser dependientes o independientes de la acción hormonal del ácido abscísico y que conducen a la tolerancia de las plantas al estrés hídrico.

Palabras clave: ácido abscísico (ABA), proteínas de embriogénesis tardía (LEA), movimiento estomático, osmolitos, elementos de respuesta a ABA (ABRE).

ABSTRACT

Water being one of the most important factors for plant development, its scarcity is considered a major source of stress. Many plant species have developed responses that allow them to tolerate different water deficit levels ranging from a mild water stress caused by water potential decrease at noon, to those found in desert habitats. The present article reviews the different plant responses that confer them the capability of tolerating and adapting to water deficit stress at the morphological, anatomical, cellular and molecular levels. These responses include changes in growth, development of C4 and CAM metabolic strategies, closure of stomata and changes in gene expression. The latter include those encoding potentially protective proteins, antioxidant and osmolyte synthesis key enzymes, and transcription factors that regulate stress induced gene expression itself. Also, it is described how these responses can occur through abscisic acid dependent and independent signaling paths, both leading to water stress tolerance.

Key words: abscisic acid (ABA), late embryogenesis abundant proteins (LEA), stomatal movement, osmolytes, ABA response elements (ABRE).

Introducción

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado diferentes respuestas y adaptaciones que les permiten sobrevivir en condiciones de constante déficit hídrico (Nilsen y Orcutt, 1996). Muchas de estas adaptaciones están relacionadas con una mayor capacidad de tomar agua o con un uso más eficiente de este recurso. Algunas plantas poseen adaptaciones como el desarrollo del metabolismo C4 y del metabolismo ácido de las crasuláceas o CAM, que les permiten explotar ambientes más áridos (Black y Osmond, 2003; Lüttge, 2004). Cuando el déficit hídrico se desarrolla lentamente, las plantas pueden presentar respuestas de aclimatación que tienen efectos sobre el crecimiento, como la disminución de la expansión foliar y el aumento del crecimiento radicular (Potters *et al.*, 2007;

Shao *et al.*, 2008). Otro mecanismo de resistencia a nivel fisiológico es el cierre de estomas, estructuras responsables de la mayor proporción de pérdida de agua en las plantas (Taiz y Zeiger, 2006). Esta respuesta está mediada por la hormona ácido abscísico (ABA) (Leung y Giraudat, 1988; Zhang y Outlaw, 2001).

Las plantas también responden al estrés por déficit hídrico a nivel celular y molecular (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Una de las principales respuestas al estrés hídrico es la modificación de la expresión génica, relacionada con la producción de enzimas clave en la vía de síntesis de osmolitos, proteínas con función protectora, enzimas antioxidantes, factores de transcripción y otras

Fecha de recepción: 10 de octubre de 2008. Aceptado para publicación: 2 de julio de 2009

¹ Departamento de Agronomía, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. lpmorenof@unal.edu.co

proteínas involucradas en las respuestas al estrés hídrico (Bray, 1997; Zhu *et al.*, 2002). Los osmolitos, principalmente compuestos orgánicos de bajo peso molecular, permiten el ajuste osmótico y facilitan la toma de agua por la planta (Cushman, 2001). Entre las proteínas más importantes por su efecto protector potencial están las LEA (*Late Embryogenesis Abundant Proteins*) y las que funcionan como antioxidantes (Danon *et al.*, 2004). Se ha propuesto que las proteínas LEA protegen proteínas y membranas del daño debido a la deshidratación (Bray, 1993). Durante el estrés hídrico también se induce la expresión de varios factores de transcripción que median la respuesta de genes a estrés hídrico algunos de los cuales se unen a secuencias específicas en la región promotora de los genes (Guiltinan *et al.*, 1990; Busk *et al.*, 1997). La sobre-expresión de muchos de estos genes en plantas de *Arabidopsis* y otras especies confiere tolerancia al estrés hídrico (Tarczynski *et al.*, 1992; Garg *et al.*, 2002; Abebe *et al.*, 2003; Shinozaki *et al.*, 2003; Hmida-Sayari *et al.*, 2005; Waditee *et al.*, 2005; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 2005; Ashraf y Foolad, 2007).

La mayoría de estas respuestas están reguladas por el ácido abscísico, aunque también se han descrito vías de regulación independientes de esta hormona (Chandler y Robertson, 1994). El ABA está involucrado en el proceso de adaptación de la planta a diferentes tipos de estrés ambiental, y se ha comprobado que durante estos estreses los niveles de ABA se incrementan en los tejidos vegetativos (Zeevaert y Creelmen, 1988). Esta relación llevó a proponer que el ABA es uno de los mediadores de dichas respuestas y que sus niveles en una planta pueden ser determinantes de su comportamiento frente a una condición de estrés (Galau *et al.*, 1986; Zeevaert y Creelmen, 1988; Bray, 1991). Estos niveles son modulados por un balance preciso entre la biosíntesis y el catabolismo de esta hormona. Aunque muchos genes que se expresan durante el estrés hídrico están regulados por el ABA, se ha encontrado que la expresión de algunos es total o parcialmente independiente de ABA (Chandler y Robertson, 1994). Esto podría sugerir la presencia de factores adicionales involucrados en la modulación de algunos genes durante estrés. En este artículo se presenta información reciente sobre las diferentes respuestas y adaptaciones de las plantas al déficit hídrico, la percepción y las vías de señalización del estrés hídrico y la expresión de genes de manera dependiente e independiente de ABA durante el estrés por déficit hídrico.

El agua en las plantas

El agua es la molécula esencial para la vida; en las plantas constituye típicamente del 80 al 95% de la masa de los teji-

dos en crecimiento y desempeña varias funciones únicas. Es el solvente más abundante y mejor conocido y, como tal, permite el movimiento de moléculas dentro y entre las células. Debido a sus propiedades polares, tiene gran influencia en la estructura y la estabilidad de moléculas tales como proteínas, polisacáridos y otras (Kirkham, 2005). Igualmente, la expansión celular y la integridad físico-química de la pared dependen del agua. Una lista de los procesos que son regulados por el volumen celular y la hidrodinámica incluyen, además de los mencionados, crecimiento y proliferación, exocitosis, endocitosis, cambios en la forma celular, señalización de hormonas, metabolismo, excitabilidad, migración celular, obtención de nutrientes, filtración de desechos, necrosis y apoptosis (Wehner *et al.*, 2003; Zonia y Munnik, 2007). Teniendo en cuenta la gran importancia del agua en las plantas, se puede considerar que una cantidad limitada o excesiva de agua para éstas constituye un factor inductor de situaciones adversas o estresantes.

La regulación final de la osmolaridad, la tensión de la membrana y la presión hidrostática es crítica para el funcionamiento celular. El agua viaja desde las zonas donde el potencial hídrico es mayor (menos negativo) hacia las zonas donde este es menor (más negativo). El potencial hídrico se define según la ecuación: $\Psi_w = p - s$ donde " Ψ_w " es el *potencial hídrico*; " p " es la *presión de turgor* o la fuerza hidrostática ejercida en la célula vegetal contra la pared celular y es de signo (+), y " s " es la *presión osmótica*, que es una medida de la concentración de los solutos (Taiz y Zeiger, 2006). La interacción del agua con los solutos disueltos en esta tiene un efecto negativo sobre el Ψ_w , ya que disminuye la cantidad de agua libre disponible en el sistema, por lo que se resta en la ecuación (Nilsen y Orcutt, 1996). La reducción en el valor del Ψ_w , consecuencia de la interacción del agua con los materiales insolubles y las paredes, define al *potencial mátrico*, que no aparece en la ecuación por haberse comprobado empíricamente que su contribución al valor del Ψ_w es despreciable en la mayoría de los casos. El turgor es, según la ecuación, directamente proporcional al potencial hídrico. La principal fuerza motora que impulsa al agua en su viaje a la parte aérea es la pérdida de agua en las hojas por transpiración. Esto supone que las hojas son los órganos de las plantas que presentan los potenciales hídricos más negativos (Zyalalov, 2004).

Estrés hídrico y respuestas de las plantas

El estrés por déficit hídrico o por sequía se produce en las plantas en respuesta a un ambiente escaso en agua, en donde la tasa de transpiración excede a la toma de agua. El

déficit hídrico no sólo ocurre cuando hay poca agua en el ambiente, sino también por bajas temperaturas y por una elevada salinidad del suelo. Estas condiciones, capaces de inducir una disminución del agua disponible del citoplasma de las células, también se conocen como estrés osmótico (Levitt, 1980).

De acuerdo con los requerimientos de agua, las plantas pueden ser consideradas como hidrófitas si están adaptadas a vivir total o parcialmente sumergidas en el agua (en general no toleran potenciales hídricos más negativos de -5 a -10 bares); como mesófitas si están adaptadas a un aporte moderado de agua (en general no toleran potenciales hídricos más negativos de -20 bares) y como xerófitas si están adaptadas a ambientes áridos (en general no toleran potenciales hídricos más negativos de -40 bares) (Nilsen y Orcutt, 1996).

Las plantas a lo largo de su desarrollo experimentan algún grado de estrés por déficit hídrico. En los sistemas naturales, un déficit de agua puede ser el resultado de bajas precipitaciones, baja capacidad de retención de agua del suelo, excesiva salinidad, temperaturas extremas frías o calientes, baja presión de vapor atmosférica o una combinación de estos factores (Nilsen y Orcutt, 1996). Por otro lado, una tercera parte de la superficie del planeta se considera como árida o semiárida, mientras que la mayoría de la superficie restante está sujeta a períodos temporales de déficit hídrico. De esta manera, el agua constituye el principal factor limitante del crecimiento de las plantas en la tierra, actuando como una fuerza selectiva de primer grado para la evolución y distribución de las especies vegetales (Hanson y Hitz, 1982).

Las plantas han respondido al estrés hídrico desarrollando evolutivamente adaptaciones tanto a nivel morfológico como anatómico y celular, que les permiten vivir en condiciones de constante estrés hídrico (Nilsen y Orcutt, 1996). 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. De esta manera, algunas plantas poseen adaptaciones tales como el desarrollo del metabolismo C4 y del metabolismo ácido de las crasuláceas o CAM, que les permiten explotar ambientes más áridos. Así, en las plantas C4 hay una separación física entre el proceso de asimilación de CO₂, que se produce en células del mesófilo y la reducción de éste a carbohidratos que tiene lugar en otro tipo celular especializado (parenquima perivascular) donde se acumula el CO₂. En este metabolismo se genera una mayor concentración de CO₂ en las células especializadas que puede estar en equilibrio con la atmósfera externa.

Esta elevada concentración de CO₂ en el sitio de carboxilación de la ribulosa bifosfato resulta en una supresión de la oxigenación (fotorrespiración).

El metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM) consiste en una separación temporal de la fijación del CO₂ respecto a las reacciones dependientes de la luz de la fotosíntesis (Black y Osmond, 2003; Lüttge, 2004). El CO₂ atmosférico se acumula durante la noche, cuando la mayor humedad del ambiente permite tener los estomas abiertos. El CO₂ se asimila como ácido málico y se almacena en la vacuola. Con la llegada del día se cierran los estomas, lo que detiene la asimilación de CO₂ y previene la pérdida de agua (Black y Osmond, 2003). Se metaboliza el ácido málico, produciéndose CO₂ que, con el ATP y el poder reductor generado en las reacciones luminosas de la fotosíntesis, va a ser reducido a carbohidratos en el ciclo de Calvin o ciclo C3 de reducción del carbono (PCR). Además, la alta concentración de CO₂ generada en el citoplasma celular reduce la fotorrespiración drásticamente y por tanto el daño oxidativo.

Las plantas también poseen mecanismos de aclimatación que se activan en respuesta a estrés hídrico (Nilsen y Orcutt, 1996). Cuando el déficit hídrico se desarrolla lentamente, se dan cambios en procesos de desarrollo que tienen varios efectos sobre el crecimiento. Uno de principal importancia es la limitación específica de la expansión foliar. Aunque el área foliar es importante, pues de ella depende la fotosíntesis, una rápida expansión foliar puede afectar negativamente la adaptación a la poca disponibilidad de agua. Otro proceso que se modifica es el crecimiento radicular. La disponibilidad de agua afecta la relación entre el crecimiento de la parte aérea y la raíz; la raíz continúa su desarrollo mientras que la parte aérea deja de crecer por causa del estrés. Así, las plantas son capaces de continuar el desarrollo de sus raíces en búsqueda de agua en zonas más profundas del suelo (Potters *et al.*, 2007; Shao *et al.*, 2008).

Otro mecanismo de resistencia a nivel fisiológico es el cierre de estomas, ya que estos son los responsables de la mayor proporción de pérdida de agua en las plantas (Taiz y Zeiger, 2006). El proceso de cierre de los estomas, cuando el mesófilo comienza a sufrir deshidratación, está regulado por el ácido abscísico (ABA) (Leung y Giraudat, 1998). El contenido de ABA en la hoja se incrementa debido a la descompartmentalización y redistribución desde los cloroplastos de las células del mesófilo y a la síntesis y transporte desde las raíces, siendo liberado al apoplasto para llegar a las células guarda a través de la corriente de transpiración (Zhang y Outlaw, 2001). Esta fitohormona produce una pérdida de iones K⁺ (calculada en 4-8 veces

de disminución, desde 400-800 mM hasta 100 mM) y de aniones Cl⁻ o malato²⁻ en las células guarda, que provoca una salida de agua del citoplasma, dando lugar al cierre del estoma (Roelfsema y Hedrich, 2002).

A nivel celular, otra respuesta de resistencia es el ajuste osmótico, que consiste en una disminución del potencial hídrico en los tejidos vegetales, lo cual tiene como consecuencia la entrada de agua y, por tanto, no se presenta una disminución en el turgor o en la productividad fotosintética. El ajuste osmótico se da en las plantas a través de la biosíntesis de osmolitos orgánicos de bajo peso molecular y por la acumulación de iones, fundamentalmente K⁺ (Cushman, 2001). En general, las enzimas son sensibles a las altas concentraciones de iones, como el Na⁺. La acumulación de iones durante el ajuste osmótico ocurre principalmente en la vacuola, mientras que en el citoplasma se acumulan solutos que no afectan negativamente la funcionalidad de macromoléculas celulares (Buchanan *et al.*, 2000). Estos solutos son moléculas orgánicas de bajo peso molecular (osmolitos) como polioles (azúcares), metilaminas, aminoácidos libres y derivados de aminoácidos. Diferentes tipos de organismos como plantas, bacterias, hongos y animales presentan osmolitos compatibles que se caracterizan por no alterar la estructura y función de las macromoléculas, cuando se acumulan en altas concentraciones. Se propone que estos osmolitos compatibles no interactúan con sustratos y cofactores enzimáticos, ni afectan negativamente las interacciones entre las macromoléculas y el solvente (Yancey *et al.*, 1982). La acumulación de osmolitos compatibles también tiene como consecuencia la osmoprotección, que está dada por la capacidad estabilizadora de algunos de estos solutos sobre macromoléculas como las proteínas y los sistemas de membrana celulares. La sobre-expresión de este tipo de compuestos ha sido usada para proteger a las plantas de los efectos causados por el estrés osmótico, obteniéndose resultados positivos en varias especies (Tarczynski *et al.*, 1992; Garg *et al.*, 2002; Abebe *et al.*, 2003; Waditee *et al.*, 2005; Hmida-Sayari *et al.*, 2005; Ashraf y Foolad, 2007).

Una respuesta molecular de las plantas al estrés, y quizá una de las más importantes, es la modificación de la expresión de genes. Durante el déficit hídrico, diferentes tipos celulares responden incrementando o disminuyendo la expresión de algunos genes. Igualmente, se ha visto que muchos genes que no se expresan en condiciones de irrigación óptima pueden empezar a hacerlo bajo déficit hídrico.

Como parte de esta respuesta molecular de las plantas al déficit hídrico se ha determinado la acumulación de pro-

teínas nuevas utilizando electroforesis uni y bidimensional (Bray, 1993). De otro lado, se han realizado estudios de rastreo diferencial de bibliotecas génicas hechas a partir de plantas estresadas y plantas bien irrigadas. Esto ha llevado a la clonación y al análisis de muchos de los genes obtenidos a partir de estos rastreos (Skriver y Mundy, 1990; Bray, 1993). Igualmente, el análisis de la expresión de genes en diferentes mutantes afectadas en la respuesta al déficit hídrico como las *aba* (bloqueadas en la síntesis de ABA) y las *abi* (insensibles a ABA) ha permitido identificar varios genes importantes en dicha respuesta. Una estrategia relevante en la identificación de genes relacionados con el estrés hídrico está basada en los ESTs (*Expressed Sequence Tag*) generados en diferentes librerías de cDNA, obtenidas a partir de tejidos sometidos a tratamientos de deshidratación. La información específica de estas librerías está indexada en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) dbESTS (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html). Otras aproximaciones recientes, como la PCR en tiempo real y los micro y macroarreglos, han permitido el análisis simultáneo de miles de genes en tejidos de plantas control y estresadas en diferentes estados de desarrollo (Chen *et al.*, 2002; Oh *et al.*, 2005; Sreenivasulu *et al.*, 2006). El principal objetivo de estos estudios fue entender el estrés hídrico a nivel molecular y hallar los genes que son importantes para la tolerancia al mismo, los cuales han desempeñado un papel, sin duda relevante, en la adaptación de las plantas a dicho estrés.

La respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés generalmente incluye la alteración en la expresión de proteínas. Estos cambios generalmente están relacionados con el aumento o la disminución de la expresión de genes específicos, y dependen de la naturaleza, duración y severidad del estrés. Aquí se revisarán aquellas que se aumentan durante la condición de estrés, ya que aunque la disminución de proteínas particulares puede tener un significado fisiológico importante, la mayoría de investigaciones se enfocan en las que se aumentan durante el estrés porque se cree que puedan tener una función adaptativa o de protección a dicha condición. Entre las más importantes por su efecto protector potencial están las proteínas LEA (*Late Embriogenesis Abundant Proteins*), las involucradas en las vías de síntesis de los osmolitos y las que funcionan como antioxidantes (Bray, 1997; Zhu *et al.*, 2002; Bartles y Kotchoni, 2003).

Un grupo grande de genes que se inducen por estrés osmótico corresponde a los genes que codifican para las proteínas LEA (Baker *et al.*, 1988; Mundy y Chua, 1988; Dure *et al.*, 1989). La expresión de estos genes en condiciones de estrés

ha sido asociada a la protección de la integridad celular y al mantenimiento de la homeostasis iónica. Las LEA son varias familias de proteínas que se acumulan en altos niveles durante la etapa madura de la embriogénesis, justo antes del inicio de la desecación de la semilla. Algunas de ellas también se acumulan en tejidos vegetativos en respuesta al estrés osmótico generado por diversos agentes ambientales (deshidratación, salinidad, frío y congelamiento) (Galau *et al.*, 1986; Baker *et al.*, 1988; Bray, 1993). Durante el desarrollo embrionario, y en la gran mayoría de los casos indicados para diferentes tipos de estrés medioambiental, la inducción de la expresión de los genes *lea* está mediada por el ABA. Esta fitohormona es capaz de inducir precozmente la expresión de dichos genes en embriones inmaduros o en tejidos vegetativos no estresados cuando se aplica exógenamente (Dure III, 1993). Las proteínas LEA son proteínas altamente hidrofílicas, ricas en glicina y en aminoácidos cargados que se caracterizan por no tener una estructura globular, y ser, por tanto, resistentes a la coagulación por efecto de las altas temperaturas (Dure III, 1993). Las proteínas LEA se agrupan en varias familias o grupos de acuerdo con la homología en la secuencia de aminoácidos, y fueron descritas primeramente por Dure en algodón (Ingram y Bartels, 1996; Colmenero-Flores *et al.*, 1997).

Se ha propuesto que las proteínas LEA protegen proteínas y membranas del daño debido a la deshidratación. El agua, como resultado de su constante dieléctrica, mantiene *in vivo* la estructura de proteínas y fosfolípidos, y es posible que proteínas tales como las LEA D-11 y D-13, las cuales forman una estructura en “*random coil*” (aminoácidos orientados al azar), sustituyan el agua y mantengan la estructura de proteínas y membranas en ausencia de esta. Para proteínas tales como la D-29, que pueden formar hélices anfífilas, se ha propuesto que puedan actuar como trampas de iones, secuestrando iones que están concentrados durante la desecación (Baker *et al.*, 1988). Aunque estas funciones no se han probado, existe evidencia circunstancial que sugiere su papel como protectoras en diferentes tipos de estrés. Se ha obtenido evidencia directa del papel de, al menos, algunas de estas proteínas en la tolerancia a la sequía, como es el caso de la Em de trigo, una proteína altamente hidrofílica, perteneciente al grupo 1, la cual fue sobre-expresada en levadura y confirió resistencia contra diferentes tipos de estrés osmótico (Swire-Clark y Marcotte, 1999). Otro ejemplo es el de la proteína LEA del grupo 3, la HVA1 de cebada, que al ser sobre-expresada en plantas de arroz confiere resistencia a estrés hídrico y salino (Xu *et al.*, 1996). Esta misma proteína, al ser expresada en levadura, confiere resistencia a estrés salino y a congelamiento (Zhang *et al.*, 2000). Otras dos proteínas fueron expresadas

en levadura, la LE25 de tomate, perteneciente al grupo 4, que confiere resistencia a estrés salino y por frío (Imai *et al.*, 1995) y la LE4 perteneciente al grupo 2, que confiere resistencia a estrés salino y a congelamiento (Zhang *et al.*, 2000). Los datos obtenidos a partir de la sobre-expresión de estas y otras proteínas LEA apoyan la hipótesis de que diferentes proteínas LEA desempeñan un papel importante en la protección contra la deshidratación celular (Wang *et al.*, 2006).

Aun cuando la mayoría de los genes *lea* se expresan en plantas sometidas a diferentes condiciones de estrés, se ha encontrado que algunos genes *lea* se expresan en diferentes órganos vegetativos durante el desarrollo normal de las plantas (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1993; Iwasaki *et al.*, 1995; Rouse *et al.*, 1996; Colmenero-Flores *et al.*, 1999, Moreno-Fonseca y Covarrubias, 2001). Su función en estas condiciones se desconoce.

Los osmolitos son compuestos que representan una función importante en el ajuste osmótico, y protegen a las células de las especies reactivas de oxígeno (Pinhero *et al.*, 2001). En muchas plantas durante condiciones de estrés hay una sobre-expresión de las enzimas clave en la biosíntesis de osmolitos como la prolina y otros aminoácidos, las poliaminas y los compuestos cuaternarios de amonio como la glicina betaina, la sacarosa, los polioles, los azúcares-alcoholes y otros oligosacáridos (Tamura *et al.*, 2003). La acumulación de prolina, además de inducir ajuste osmótico, protege las membranas y las proteínas de la deshidratación, y actúa como desintoxicador de radicales libres. Otros osmolitos como la glicina betaina solo ocurren en algunas plantas superiores, y su síntesis puede ser inducida tanto por estrés hídrico como por estrés salino, por sobre-expresión de las enzimas colina mono-oxigenasa (CMO) y betaina aldehído deshidrogenasa (Nakamura *et al.*, 2001). La glicina betaina ha mostrado proteger enzimas y membranas, así como estabilizar complejos proteína-pigmento del PSII en condiciones de estrés (Papageorgiou y Morata, 1995). La sobre-expresión de estos y otros osmolitos en plantas transgénicas confieren un cierto grado de tolerancia al estrés hídrico (Cortina y Culiáñez-Macià, 2005; Ashraf y Foolad, 2007).

Otro grupo de proteínas que se sobre-expresan durante el estrés hídrico son las enzimas antioxidantes que, junto con compuestos no proteicos, detoxifican a las plantas de los radicales libres. Estos radicales como el superóxido y el peróxido de hidrógeno se generan debido a un aumento en la tasa de fotorreducción del O₂ en los cloroplastos (Robinson y Bunce, 2000). Entre las principales enzimas

están la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT), la ascorbato peroxidasa (APX), la peroxidasa (POD), la glutatión reductasa (GR) y la monodehidroascorbato reductasa (MDAR) (Apel y Hirt, 2004). Otro grupo de proteínas que se expresan durante estrés hídrico incluye las de choque término, las proteínas transportadoras de iones y aquellas que permiten el transporte de agua (acuaporinas), las proteasas, las proteínas kinasas, las fosfatasa, las proteínas involucradas en el metabolismo de los fosfolípidos y los factores transcripcionales.

El ácido abscísico en la planta: percepción y traducción de señales

El ABA regula dos procesos básicos para el desarrollo de las plantas; uno es la maduración y germinación de la semilla, donde está involucrado en los procesos de adquisición de la dormancia, acumulación de reservas nutritivas y adquisición de la tolerancia a desecación (Busk y Pagés, 1998; Leung y Giraudat, 1998). De otro lado, está involucrado en el proceso de adaptación de la planta a diferentes tipos de estrés ambiental como el frío, la salinidad y la deshidratación. Se ha comprobado que durante estos estreses los niveles de ABA se incrementan en tejidos vegetativos. Esta relación llevó a proponer que el ABA es uno de los mediadores de dichas respuestas (Galau *et al.*, 1986; Zeevaart y Creelmen, 1988; Bray, 1991). Así, los niveles de ácido abscísico en una planta serían determinantes de su comportamiento frente a una condición de estrés. Estos niveles son modulados por un balance preciso entre la biosíntesis y el catabolismo de esta hormona.

La fitohormona ABA es sintetizada a partir del precursor carotenoide C40, por la vía 2-C-metil-d-eritritol-4-fosfato (MEP). La primera enzima relacionada directamente con su síntesis es la 9-*cis*-epoxicarotenoide dioxigenasa (NCED), la cual está localizada en los plástidos y rompe un precursor epoxicarotenoide para formar xantosina (C15) y un metabolito (C25). La forma biológicamente activa de ABA se produce a partir de *cis*-xantosina por dos pasos enzimáticos vía aldehído abscísico y es catalizada por AtABA2. La oxidación del aldehído abscísico a ácido carboxílico es el último paso en la biosíntesis del ABA y es catalizado por una abscísico aldehído oxidasa (AAO), la cual requiere un cofactor molibdeno (MoCo) para su actividad catalítica (Cutler y Krochko, 1999; Nambara y Marion-Poll, 2005). Además de esta vía, hay evidencia que sugiere la existencia de al menos otra vía alternativa menor (Tabaeizadeh, 1998). Se ha propuesto que la NCED es la principal enzima reguladora debido a que su expresión está correlacionada con los niveles endógenos de ABA (Schwartz *et al.*, 2003).

Adicional a esta regulación, la sobre-expresión de genes que codifican enzimas regulatorias de la vía MEP (1-doexi-D-xylulosa 5-fosfato sintasa), de la biosíntesis de carotenoides (fitoeno sintasa) y del ciclo de las xantofilas (ZEP) causan un aumento en la acumulación de ABA en semillas y plántulas (Marín *et al.*, 1996; Frey *et al.*, 1999; Estévez *et al.*, 2001). Durante el estrés abiótico varios de estos genes están sobre-expresados. En *N. plumbaginifolia*, *L. esculentum* y *Arabidopsis* la expresión del gen *zep* se induce en raíces por estrés hídrico rápido o progresivo (Audran *et al.*, 1998; Bittner *et al.*, 2001). La inducción de la expresión del gen *nced*, en condiciones de estrés hídrico, se ha observado en raíces y hojas en varias especies incluyendo *P. vulgaris* y *Arabidopsis*. Adicionalmente, la sobre-expresión del gen *Atnced3* en plantas transgénicas de *Arabidopsis* aumentan los niveles de ABA y la tolerancia a la deshidratación (Tian *et al.*, 2004; Melhorn *et al.*, 2008).

Por vías catabólicas los niveles de ABA activo en las plantas pueden disminuirse por un proceso de degradación y por la conjugación con azúcares. En el proceso de degradación, el ABA es primero hidrolizado a 8'-hidroxi ABA (C-8'), el cual es convertido a ácido faseico. La familia de genes *P450 CYP707* de *Arabidopsis* codifica para las enzimas que catalizan este paso (Kushiro *et al.*, 2004). El análisis de estos genes indica que su expresión está regulada tanto por estrés como por desarrollo. En la otra vía, el ABA es conjugado con la glucosa por una ABA glucosiltransferasa para obtener una forma fisiológicamente inactiva, ABA glucosil ester (Hirayama y Shinozaki, 2007) que es liberada por una β -glucosidasa (BG). En *Arabidopsis* se determinó que la proteína AtBG1 está involucrada en la regulación de los niveles endógenos de ABA (Hirayama y Shinozaki, 2007). En *Arabidopsis* se induce la expresión de varios genes *cyp70a* en respuesta a deshidratación y más aún durante la rehidratación. Igualmente se ha observado que los tratamientos de estrés activan la AtBG1 a través de polimerización. La liberación del ABA por la AtBG1 es suficiente para inducir la expresión de genes de respuesta a estrés, lo cual sugiere que la AtBG1 contribuye al aumento de los niveles intra y extracelulares de ABA (Hirayama y Shinozaki, 2007).

En muchos casos, las mutantes *aba* (con reducidos niveles de ABA endógeno) y *abi* (insensibles al ABA) han sido usadas para apoyar la hipótesis de que el ABA endógeno regula la expresión génica (Chandler y Robertson, 1994). La mayoría de estas mutantes muestran una excesiva pérdida de agua debido a los defectos en la regulación estomatal, la cual lleva a un incremento en la tendencia a marchitez. Igualmente, genes que se regulan a través del

ABA presentan en estas mutantes niveles muy bajos de expresión durante las diferentes condiciones de estrés y durante la embriogénesis (Giraudat *et al.*, 1994).

Recientemente se han descrito varios receptores potenciales de ABA que incluyen una proteína FCA que regula el tiempo de floración (Razem *et al.*, 2006), la subunidad H de una Mg-quelataza (Shen *et al.*, 2006) y la proteína G (GCR2) acoplada a receptor (Liu *et al.*, 2007). Estudios en los que se ha utilizado el ABA conjugado a una proteína o a un compuesto químico han indicado sitios de reconocimiento para el ABA tanto en la superficie celular como en los espacios intracelulares (Bray, 1997; Finkelstein *et al.*, 2002). La identificación de varios receptores parece consistente con estas observaciones; sin embargo, aún no está claro si estos receptores están involucrados en vías de señalización que modifican las respuestas de las plantas a los estreses ambientales. Después de tratamientos con ABA en las células se acumulan segundos mensajeros como Ca^{2+} y ácido fosfatídico (PA). Además se han descrito otros segundos mensajeros como las especies reactivas de oxígeno (ROS) (Laloi *et al.*, 2004; Pitzschke *et al.*, 2006) el óxido nítrico y componentes relacionados con los fosfolípidos, como el fosfatidil inositol 3-fosfato y el inositol trifosfato (Hirayama y Shinozaki, 2007). Igualmente hay evidencias que revelan la conexión entre los segundos mensajeros y los componentes de las vías de señalización en respuesta al ABA. Se han identificado dos proteínas fosfatasas de la clase 2C serina/treonina (PP2Cs), la ABI1 y la ABI2, que se han colocado en la parte superior de la vía de transducción. Las mutantes en estos genes, *abi1-1* y *abi2-1*, son denominadas marchitas, carecen de dormancia y tienen una sensibilidad reducida a ABA exógeno respecto a la inhibición de la germinación (Koornneef *et al.*, 1984). Estas actúan paralelamente a la vía mediada por la adenosin 5'-difosfato ribosa cíclica (cADPR) y el Ca^{2+} (Himmelbach *et al.*, 1998; Himmelbach *et al.*, 2003). Se ha sugerido que las fosfatasas (PP2Cs) son parte de un mecanismo de control negativo ejercido por un represor que ejerce su control negativo en forma fosforilada y se inactiva al ser desfosforilado por las fosfatasas. En este contexto, la activación de las fosfatasas (PP2Cs) por un incremento en el pH inducido por ABA, lleva a la inactivación del represor y, por tanto, promueve la señalización de la vía de cADPR (Himmelbach *et al.*, 2003). Igualmente se ha encontrado que las especies reactivas de oxígeno como el H_2O_2 reducen la actividad PP2C de ABI1 y ABI2 *in vitro*.

Estudios recientes han mostrado una conexión entre la PP2C y una quinasa relacionada a SNF1 (SnRKs), específicamente kinasas tipo SnRK2 y SnRK3. Estudios genéticos y

bioquímicos han mostrado la función clave de la SnRK2 en el movimiento de los estomas, la expresión de genes en respuesta a ABA y las respuestas a ABA durante condiciones de estrés y en la germinación (Johnson *et al.*, 2002; Fujii *et al.*, 2007). Además, OST1, una proteína quinasa que media la regulación de la apertura de los estomas en respuesta a ABA en *Arabidopsis*, requiere una función normal de ABI1 para su activación dependiente del ABA. La SnRK2s para su activación necesita la fosforilación en varios residuos Ser/Thr en el lazo P, lo que sugiere que otras kinasas pueden funcionar por encima de la SnRK2s en la vía de señalización de ABA (Kobayashi *et al.*, 2005). Alternativamente estos residuos podrían autofosforilarse, en respuesta a algunos estímulos que activan estas kinasas, y PPC2 podría regular su estado. Debido a la importancia del Ca^{2+} como segundo mensajero en la respuesta a ABA, la función de CDPK en respuesta a ABA ha sido ampliamente estudiada (Cheng *et al.*, 2002). En estudios recientes se identificó la función de CDPK en la respuesta a ABA al comprobarse que AtCPK32 regula factores de transcripción relacionados con el ABA (ABRE BINDING FACTOR) como el 4/ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN (AREB) (Choi *et al.*, 2005). ABA también activa cascadas de proteínas kinasas activadas por mitógenos (MAPK) y se ha encontrado que la fosforilación en muchos factores de transcripción de respuesta a ABA y a estrés es necesaria para su funcionamiento (Yamaguchi-Shinosaki y Shinosaki, 2006). Recientemente también se ha acumulado evidencia que sugiere que la respuesta a ABA incluye metabolismo de RNAm. Aunque la vía de señalización que se genera a través de ABA durante el estrés aún no se ha caracterizado completamente, a través de muchos estudios se ha encontrado evidencia de que esta vía interactúa con otras vías de señalización que tampoco han sido descritas. Por ejemplo la expresión del gen *lea cor47* presenta un efecto aditivo en respuesta a tratamientos de ABA y manitol (Chak *et al.*, 2000). Estos investigadores, usando mutantes semi-dominantes *abi1* y *abi2*, encontraron que la expresión génica estaba más dañada en *abi2* en respuesta a estrés inducido por manitol que en la mutante *abi1*. Es probable que en la respuesta a estrés haya vías solapadas o en interacción, las cuales son dependientes e independientes ABA (Bray, 2002).

Expresión de genes durante el estrés dependiente de ABA

Se ha determinado que una parte importante de la respuesta fisiológica a ABA se da a través de la expresión génica *de novo* (Bohnert y Jensen, 1996). Muchos genes que se expresan durante la fase tardía de desarrollo del embrión pueden ser inducidos por el ABA exógeno en embriones

y tejido vegetativo (Mundy y Chua, 1988). También se ha determinado que los niveles endógenos de ABA se incrementan en diferentes condiciones de estrés, incluido el déficit hídrico. Estos datos, junto con el estudio de promotores y la caracterización de las mutantes deficientes en ABA de *A. thaliana* y de maíz, apoyan la participación del ABA endógeno en la regulación de la expresión de genes durante estrés. Estos cambios en la expresión génica le pueden conferir a la planta la habilidad para responder apropiadamente al estrés y sobrevivir a dicha condición. Sin embargo, no todos los genes que se inducen bajo estrés tienen una función adaptativa, ya que muchos de estos cambios en la expresión son efectos de daños a nivel celular. Las plantas sometidas a déficit hídrico presentan alteraciones en procesos fisiológicos y metabólicos, como reducción en las tasas de fotosíntesis, disminución de la síntesis de proteínas totales y en las tasas de crecimiento. Estas alteraciones pueden ocasionar un cambio en el nivel de expresión de genes específicos que indica el daño y que no están involucrados en procesos de adaptación a la condición estresante.

Los genes inducidos durante estrés a través del ABA pueden dividirse en dos grupos. Están los que se inducen por 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 una manera dependiente de la síntesis *de novo* de proteínas (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996). La disección funcional de los promotores de los genes que responden al ABA, basada principalmente en sistemas de expresión transitoria, ha permitido la identificación de varios elementos en *cis* involucrados en la expresión de genes por ABA (Bray, 2002; Hirayama y Shinozaki, 2007).

En la regulación transcripcional de genes por el ABA se han identificado factores que actúan tanto en *cis* como en *trans*. La caracterización de los promotores de los genes inducibles por ABA, *Em* de trigo y *rab16A* de arroz, mostró que un elemento en *cis* conocido como ABRE (*Abscisic Acid Response Element*) es importante para la transcripción dependiente de ABA (Guiltinan *et al.*, 1990). Actualmente, más de 20 elementos tipo ABRE funcionales han sido hallados en promotores de genes que responden al ABA. El elemento es definido como una secuencia de 8-10 pares de bases con una secuencia ACGT, que corresponde al núcleo o centro del factor transcripcional en *cis* conocido como caja G. Las secuencias que flanquean el núcleo de ACGT son importantes para el funcionamiento *in vivo* de este elemento. Estudios de expresión indican

que la secuencia (C/T)ACGTGGC es un ABRE fuerte; sin embargo, otras secuencias son igualmente funcionales (Busk y Pagés, 1998). En plantas se han clonado varios factores de transcripción en *trans* con dominios básicos, tipo cremalleras de leucina (bZip), que se unen al ABRE como dímeros.

El ABRE no es el único elemento que tiene un núcleo de ACGT; estos elementos ACGT son hallados en muchos promotores y median la inducción por luz, anaerobiosis, luz UV y ácido cumárico. Por tanto, es evidente que, además del núcleo ACGT, otros factores son importantes para determinar su especificidad. Por tal razón, no todas las secuencias que tienen un núcleo de ACGT funcionan como ABRE, aunque estén en un promotor de un gen inducible por ABA. Así, el elemento ABRE es una secuencia que contiene un ACGT y que está definido más por su función, ya que las secuencias que lo flanquean no muestran consenso (Busk y Pagés, 1998).

Para los genes *hva1* y *hva22* se encontró que además de los elementos que contienen núcleos de ACGT se requieren secuencias adicionales denominadas CE (*coupling elements*) para mediar la inducción de estos genes en respuesta a ABA (Shen *et al.*, 1996). A partir del análisis de estos promotores, se determinó el complejo mínimo de respuesta a ABA (ABRC) que consta de un *coupling element* y un ABRE capaces de conferir inducción por ABA a un promotor mínimo (Vasil *et al.*, 1995). Las secuencias de los elementos CE son diferentes pero presentan un alto contenido de citocinas y guaninas. Los ABRC también pueden estar compuestos por dos cajas G, como sucede en el promotor del gen *Em* de trigo. En contraste, otros ABRC constan de un ABRE y de un elemento en *cis* no relacionado con la caja G (Busk y Pagés, 1998; Leung y Giraudat, 1998).

Entre los elementos que median la respuesta al ABA se han descrito elementos tipo Myb y Myc en el gen *rd22* de *A. thaliana*. Puesto que estos elementos median la respuesta del gen *rd22* a estrés hídrico y parecen regular la inducción de una manera dependiente de la síntesis de proteínas, se ha sugerido que Myb y Myc pueden regular genes cuya inducción por ABA depende de la síntesis de proteínas, lo cual no sucede en la regulación vía ABRE (Iwasaki *et al.*, 1995; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994; Abe *et al.*, 1997). Sin embargo, los genes *rab16A* y *OsEm* que están regulados a través de ABRE requieren síntesis de proteínas para su inducción, y esta regulación podría depender de la síntesis *de novo* de una proteína tipo cremallera de leucina (bZip).

Otros elementos en *cis* involucrados en la inducción de la transcripción por ABA incluyen el sph o ASCE que media la inducción del gen C1 en el endospermo de maíz (Hattori *et al.*, 1992), un elemento del promotor del gen *cdet274-45* de *C. plantagineum* y el motivo TT del gen *dc3* de zanahoria (Kim *et al.*, 1997); este último motivo es considerado como un ABRE imperfecto.

Expresión de genes durante el estrés independiente de ABA

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 mRNA y los niveles de ABA en estas condiciones. Estas evidencias sugieren fuertemente que la expresión de algunos genes durante deshidratación es total o parcialmente independiente de ABA (Chandler y Robertson, 1994). Se ha planteado que esto podría sugerir la presencia de factores adicionales involucrados en la modulación de algunos genes durante estrés. Algunos estudios que involucran aplicaciones exógenas de ABA indican que los niveles de expresión de genes inducidos por ABA pueden ser incrementados por factores adicionales presentes solamente en plantas estresadas (Chandler y Robertson, 1994). De esta manera, las plantas no estresadas carecen de los elementos capaces de interactuar con ABA, y por tanto no alcanzan los niveles adecuados de expresión presentes en la condición de estrés. Estos factores, presentes en las plantas estresadas, podrían interactuar sinérgicamente con los factores inducidos por ABA para generar una respuesta mayor.

Cabe señalar que algunos genes son inducidos por ABA, pero su expresión durante deshidratación es independiente de ABA. Por ejemplo el gen de la kinasa *RPK1*, aislado de *A. thaliana*, es inducido tanto por deshidratación como por tratamiento con ABA (Hong *et al.*, 1997). Al examinar la respuesta a deshidratación de este gen en las mutantes de *A. thaliana* deficientes en la síntesis de ABA (*aba-1*) y en las mutantes insensibles (*abi-1*, *abi-2* y *abi-3*), se encontraron los mismos niveles de mRNA respecto a las plantas control.

Analizando el promotor del gen *rd29A* de *A. thaliana* (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994) se identificó un elemento en *cis* de 9 pares de bases, de respuesta a deshidratación (DRE). Este elemento DRE es necesario para la inducción por estrés del gen *rd29A*, aun en ausencia de niveles elevados de ABA. La misma secuencia ha sido hallada en promotores de otros genes que responden a ABA (Busk

et al., 1997) y en genes regulados por estrés osmótico y baja temperatura en *Arabidopsis* (Iwasaki *et al.*, 1995). Estos genes se inducen por el respectivo estrés en las mutantes de *A. thaliana* *aba* o *abi*, lo cual sugiere que la expresión de estos genes bajo estrés no requiere ABA, aunque respondan a tratamientos con ABA. Estas observaciones prueban que la habilidad de un gen para responder a ABA, en condiciones óptimas de crecimiento, no implica necesariamente que la respuesta de este gen bajo estrés esté regulada a través de ABA. Es posible que ABA participe como modulador de la expresión de este gen en otras condiciones de estrés o de desarrollo. Varios factores de transcripción, que interactúan con la secuencia DRE de 9 pares de bases, han sido detectados en extractos nucleares de plantas de *Arabidopsis* no tratadas y deshidratadas (Nakashima *et al.*, 2000). La sobre-expresión de los genes *rd29A* y *dreb1a* de *Arabidopsis* en plantas de papa produjeron un incremento en la tolerancia al congelamiento (Behnam *et al.*, 2007). Recientemente, en *Arabidopsis*, se descubrieron dos proteínas, DRIP1 y DRIP2, que interactúan con el factor DREB2A y que *in vitro* pueden mediar la ubiquitinización de este factor, funcionando como reguladores negativos en la respuesta de las plantas a estrés hídrico (Qin *et al.*, 2008).

Con base en estos datos, Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki (1996) plantean la existencia de al menos cuatro vías independientes de regulación génica durante estrés 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 (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994). Se ha demostrado que la vía independiente para frío también está regulada por elementos tipo DRE/CTR que responden exclusivamente a frío (Nakashima *et al.*, 2000).

Conclusiones

Diferentes aproximaciones metodológicas han permitido la caracterización progresiva de genes individuales y la identificación de vías asociadas con la señalización inter e intracelular inducida por el estrés por déficit hídrico. Aunque aún faltan muchos de los componentes involucrados en las respuestas al déficit hídrico, en los últimos años se ha avanzado notablemente en el conocimiento de las bases moleculares de estas respuestas en las plantas. La caracterización de estos genes y vías permite tener una mejor comprensión de los mecanismos bioquímicos y fisiológicos involucrados en la tolerancia al estrés que han desarrollado muchas plantas a lo largo de su proceso evolutivo. Debido al cambio climático y los procesos de desertización que ocurren en todo el mundo, en un futuro probablemente

la única manera de cultivar plantas sea en condiciones de déficit hídrico permanente. Desde esta perspectiva es necesario tener cultivares con mayor resistencia o tolerancia al déficit hídrico. Aunque la mayoría de las plantas que presentan ventaja frente al estrés hídrico no son de interés económico, es posible obtener plantas cultivables tolerantes, por transferencia genética. Muchos de los genes que se inducen por estrés caracterizados en los diferentes estudios citados y en otros, son candidatos potenciales para la producción de plantas cultivables tolerantes o resistentes al déficit hídrico.

Literatura citada

- Abe, H., K. Yamaguchi-Shinosaki, T. Urao, T. Iwasaki, D. Hosokawa y K. Shinosaki. 1997. Role of *Arabidopsis* MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid-regulated gene expression. *Plant Cell* 9, 1859-1868.
- Abebe, T., A.C. Guenzi, B. Martin y J.C. Cushman. 2003. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol.* 131, 1748-1755.
- Apel, K. y H. Hirt. 2004. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55, 373-399.
- Ashraf, M. y M.R. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Expe. Bot.* 59, 206-216.
- Audran, C., C. Borel, A. Frey, B. Sotta y C. Meyer. 1998. Expression studies of the zeaxanthin epoxidase gene in *Nicotiana glauca*. *Plant Physiol.* 118, 1021-1028.
- Baker, J., C. Steele y L. Dure III. 1988. Sequence and characterization of 6 *Lea* proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.* 11, 277-291.
- Bartles, D. y S.O. Kotchoni. 2003. Water stress induces the up-regulation of a specific set of genes in plants: aldehyde dehydrogenases as an example. *Bulg. J. Plant Physiol, Special Issue*, 37-51.
- Behnam, B., A. Kikuchi, F. Celebi-Toprak, M. Kasuga, K. Yamaguchi-Shinosaki y K. Watanabe. 2007. *Arabidopsis* rd29A::DREB1A enhances freezing tolerance in transgenic potato. *Plant Cell Rep.* 26(8), 1275-1282.
- Bittner, F., M. Oreb y R.R. Mendel. 2001. ABA3 is a molybdenum cofactor sulfurase required for activation of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 276, 40381-40384.
- Black, C.C. y B. Osmond. 2003. Crassulacean acid metabolism photosynthesis: "working the night shift". *Photosynth. Res.* 76, 329-341.
- Bohnert, H.J. y R.G. Jensen. 1996. Strategies for engineering water-stress tolerance in plants. *Trends Biotech.* 14, 89-97.
- Bray, E.A. 1991. Regulation of gene expression by endogenous ABA during drought stress. pp. 81-96. En: Davies, W.J. y H.G. Jones (eds.). *Abscisic acid, physiology and biochemistry*. Bios Scientific Publisher, Lancaster, UK.
- Bray, E.A. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103, 1035-1040.
- Bray, E.A. 1997. Plant responses to water deficit. *Trends Plant Sci.* 2, 48-54.
- Bray, E.A. 2002. Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. *Plant Cell Environ.* 25, 153-161.
- Buchanan, B.B., W. Gruissem y R.L. Jones. 2000. *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- Busk, P.K., A.B. Jensen y M. Pagés. 1997. Regulatory elements *in vivo* in the promoter of the abscisic acid responsive gene *rab17* from maize. *Plant J.* 11, 1285-1295.
- Busk, P.K. y M. Pagés. 1998. Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol. Biol.* 37, 425-435.
- Chak, R.F.K., T.L. Thomas, R.S. Quatrano y C.D. Rock. 2000. The genes *ABI1* and *ABI2* are involved in abscisic acid- and drought inducible-expression of the *Daucus carota* L *Dc3* promoter in guard cells of transgenic *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Planta* 210, 875-883.
- Chandler, M.P. y M. Robertson. 1994. Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 113-141.
- Chen, W., N.J. Provarta, J. Glazebrook, F. Katagiria, H. Changa, T. Eulgem, F. Mauch, S. Luand, G. Zoua, S.A. Whitham, P.R. Budwortha, Y. TAO, Z. Xie, X. Chene, S. Lame, J.A. Krepsa, J.F. Harperf, A. Si-Ammourc, B. Mauch-Manic, M. Heinleing, K. Kobayashig, T. Hohng, J.L. Dangelb, X. Wang y T. Zhu. 2002. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses. *Plant Cell* 14, 559-574.
- Cheng, S.H., M.R. Willmann, H.C. Chen y J. Sheen. 2002. Calcium signaling through protein kinases. The *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase gene family. *Plant Physiol.* 129, 469-485.
- Choi, H.I., H.J. Park, J.H. Park, S. Kim, M.Y. Im, H.H. Seo, Y.W. Kim, I. Hwang y S.Y. Kim. 2005. *Arabidopsis* calcium-dependent protein kinase AtCPK32 interacts with ABF4, a transcriptional regulator of abscisic acid-responsive gene expression, and modulates its activity. *Plant Physiol.* 139, 1750-1761.
- Colmenero-Flores, J.M., F. Campos, A. Garcarrubio y A.A. Covarrubias. 1997. Characterization of cDNA clones responsive to water deficit from *Phaseolus vulgaris*: a new late embryogenesis abundant protein. *Plant Mol. Biol.* 35, 393-405.
- Colmenero-Flores, J.M., L.P. Moreno, C.E. Smith y A.A. Covarrubias. 1999. *Pvlea-18*, a member of a new late-embryogenesis-abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well-irrigated bean seedlings. *Plant Physiol.* 120, 93-103.
- Cortina, C. y F.A. Culiáñez-Macià. 2005. Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Sci.* 169, 75-82.
- Cushman, J.C. 2001. Osmoregulation in plants: implications for agriculture. *Amer. Zool.* 41, 758-769.
- Cutler, J.A. y E.J. Krochko. 1999. Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci.* 4, 472-478.
- Danon, A., K. Apel y C. Laloi. 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 323-328.

- Dure, III, L. 1993. Structural motifs in *Lea* proteins. pp. 91-103. En: Close, T.J. y E. Bray (eds.). Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD.
- Dure, L., M. Crouch, J. Harada, T.H.D. Ho, J. Mundy, R. Quatrano, T. Thomas, y Z.R. Sung. 1989. Common amino acid sequence domains among the *Lea* proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 12, 475-486.
- Estévez, J.M., A. Cantero, A. Reindl, S. Reichler y P. Leon. 2001. 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *J. Biol. Chem.* 276, 22901-22909.
- Finkelstein, R.R., S.S.L. Gampalab y D.R. Christopher. 2002. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. *Plant Cell* 14, (suppl.) S15-S45.
- Frey, A., C. Audran, E. Marin, B. Sotta y A. Marion-Poll. 1999. Engineering seed dormancy by the modification of zeaxanthin epoxidase gene expression. *Plant Mol. Biol.* 39, 1267-1274.
- Fujii, H., P.E. Verslues y J.K. Zhu. 2007. Identification of two protein kinases required for abscisic acid regulation of seed germination, root growth, and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 485-494.
- Galau, G.A., D.W. Hughes y L. Dure. 1986. Abscisic acid induction of cloned cotton late embryogenesis abundant (*lea*) mRNAs. *Plant Mol. Biol.* 7, 155-170.
- Garg, A.K., J. Kim, T.G. Owens, A.P. Ranwala, Y.D. Choi, L.V. Kochian y R.J. Wu. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *PNAS* 99(25), 15898-15903.
- Giraudat, J., F. Parcy, N. Bertauche, F.J.L. Gosti y P.C. Morris, M. Bouvier-Durand y N. Vartanian. 1994. Current advances in abscisic acid action and signalling. *Plant Mol. Biol.* 26, 1557-1577.
- Guiltinan, M.J., W.R. Marcotte y R.S. Quatrano. 1990. A plant leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science* 250, 267-271.
- Hanson, A.D. y W.D. Hitz. 1982. Metabolic responses of mesophytes to plant water deficits. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 33, 163-203.
- Hattori, T., V. Vasil, L. Rosenkras, L.C. Hannah, D.R. McCarty y I.K. Vasil. 1992. The *viviparous-1* gene and abscisic acid activate the C_1 regulatory gene for anthocyanin biosynthesis during seed maturation in maize. *Genes Dev.* 6, 609-618.
- Himmelbach, A., M. Iten y E. Grill. 1998. Signalling of abscisic acid to regulate plant growth. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 353, 1439-1444.
- Himmelbach, A., Y. Yang y E. Grill. 2003. Relay and control of abscisic acid signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 470-479.
- Hmida-Sayari, A., R. Gargouri-Bouزيد, A. Bidani, L. Jaoua, A. Savoure y S. Jaoua. 2005. Overexpression of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase increases proline production and confers salt tolerance in transgenic potato plants. *Plant Sci.* 169, 746-752.
- Hong, S.W., J.H. Jon, J.M. Kwak y J.H. Nam. 1997. Identification of a receptor-like protein kinase gene rapidly induced by abscisic acid, dehydration, high salt and cold treatments in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 63, 531-535.
- Hirayama, T. y K. Shinozaki. 2007. Perception and transduction of abscisic acid signals: key to the function of the versatile plant hormone ABA. *Trends Plant Sci.* 12(8), 1360-1385.
- Imai, R., L. Chang, A. Ohta, E.A. Bray y M. Takagi. 1995. A *lea*-class gene of tomato confers salt and freezing tolerance when expressed in *Sacharomyces cerevisiae*. *Gene* 170, 243-248.
- Ingram, J. y D. Bartels. 1996. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 47, 377-403.
- Iwasaki, T., K. Yamaguchi-Shinozaki y K. Shinozaki. 1995. Identification of a *cis* regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Mol. Genet.* 247, 391-398.
- Johnson, R.R., R. Wagner, S.D. Verhey y M.K. Walker-Simmons. 2002. The abscisic acid-responsive kinase PKABA1 interacts with a seed-specific abscisic acid response element-binding factor, TaABF, and phosphorylates TaABF peptide sequences. *Plant Physiol.* 130, 837-846.
- Kim, S.Y., H.J. Chung y T.L. Thomas. 1997. Isolation of a novel class of bZIP transcription factors that interact with ABA-responsive and embryo-specification elements in the Dc3 promoter using a modified yeast one-hybrid system. *Plant J.* 11, 1235-1251.
- Kirkham, M.B. 2005. Principles of soil and plant water relations. Elsevier Academic Press, Amsterdam, The Netherlands.
- Kobayashi, Y., M. Murata, H. Minami, S. Yamamoto y Y. Kagaya. 2005. Abscisic acid-activated SNRK2 protein kinases function in the gene-regulation pathway of ABA signal transduction by phosphorylating ABA response element-binding factors. *Plant J.* 44, 939-949.
- Koornneef, M., G. Reuling y C.M. Carssen. 1984. The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 61, 377-383.
- Kushiro, T., M. Okamoto, K. Nakabayashi, K. Yamagishi, S. Kitamura, T. Asami, N. Hirai, T. Koshiba, Y. Kamiya y E. Nambara. 2004. The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 80-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO J.* 23, 1647-1656.
- Laloi, C., K. Apel y A. Danon. 2004. Reactive oxygen signalling: the latest news. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 323-328.
- Leung, J. y J. Giraudat. 1998. Abscisic acid signal transduction. *Ann. Rev. plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49, 199-222.
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Academic Press, New York, NY.
- Liu, X., Y. Yue, B. Li, Y. Nie, W. Li, W.H. Wu y L. Ma. 2007. A G protein-coupled receptor is a plasma membrane receptor for the plant hormone abscisic acid. *Science* 315, 1712-1716.
- Lüttge, U. 2004. Ecophysiology of crassulacean acid metabolism. *Ann. Bot.* 93, 629-652.
- Marín, E., L. Nussaume, A. Quesada, M. Gonneau y B. Sotta. 1996. Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* 15, 2331-2342.
- Melhorn, V., K. Matsumi, H. Koiwai, K. Ikegami, M. Okamoto, E. Nambara, F. Bittner y T. Koshiba. 2008. Transient expression

- of *atNCED3* and *AAO3* genes in guard cells causes stomatal closure in *Vicia faba*. *J. Plant Res.* 121(1), 125-131.
- Moreno-Fonseca, L.P. y A.A. Covarrubias. 2001. Downstream DNA sequences are required to modulate *Pvlea-18* gene expression in response to dehydration. *Plant Mol. Biol.* 45, 501-515.
- Mundy, J. y N.H. Chua. 1988. Abscisic acid and water-stress induce the expression of a novel rice gene. *EMBO J.* 7, 2279-2286.
- Nakashima, K., Z.K. Shinwari, M. Seki, S. Miura, K. Shinozaki y K. Yamaguchi-Shinozaki. 2000. Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration- and high-salinity-responsive gene expression. *Plant Mol. Biol.* 42, 657-665.
- Nakamura, T., M. Nomura, H. Mori, A.T. Jagendorf, A. Ueda y T. Takabe. 2001. An isozyme of betaine aldehyde dehydrogenase in barley. *Plant Cell Physiol.* 42, 1088-1092.
- Nambara, E. y A. Marion-Poll. 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 165-185.
- Nilsen, E.T. y D.M. Orcutt. 1996. Physiology of plants under stress. Abiotic factors. John Wiley and Sons, New York, NY.
- Oh, S.J., S.I. Song, Y.S. Kim, H.J. Jang, S.Y. Kim, M. Kim, Y.K. Kim, B.H. Nahm y J.K. Kim. 2005. *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiol.* 138, 341-351.
- Papageorgiou, G.C. y N. Morata. 1995. The usually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function in the oxygen evolving photosystem-II complex. *Photosynth. Res.* 44, 243-252.
- Pinhero, R.G., M.V. Rao, G. Palyath, D.P. Murr y R.A. Fletcher. 2001. Changes in the activities of antioxidant enzymes and their relationship to genetic and paclobutrazol-induced chilling tolerance of maize seedlings. *Plant Physiol.* 114, 695-704.
- Pitzschke, A., C. Forzani y H. Hirt. 2006. Reactive oxygen species signaling in plants. *Antiox. Redox Signal.* 8, 1757-1764.
- Potters, G., T.P. Pasternak, Y. Guisez, K.J. Palme y M.A.K. Jansen. 2007. Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends Plant Sci.* 12(3), 99-105.
- Qin, F., Y. Sakuma, L.-S.P. Tran, K. Maruyama, S. Kidokoro, Y. Fujita, M. Fujita, T. Umezawa, Y. Sawano, K.-I. Miyazono, M. Tanokura, K. Shinozaki y K. Yamaguchi-Shinozaki. 2008. *Arabidopsis* DREB2A-Interacting Proteins Function as RING E3 Ligases and Negatively Regulate Plant Drought Stress-Responsive Gene Expression. *Plant Cell* 20(6), 1693-1707.
- Razem, F.A., A.E. Kereamy, S.R. Abrams y R.D. Hill. 2006. The RNA-binding protein FCA is an abscisic acid receptor. *Nature* 439, 290-294.
- Robinson, M. y J.A. Bunce. 2000. Influence of drought-induced water stress on soybean and spinach leaf ascorbate/dehydroascorbate level and redox status. *Int. J. Plant Sci.* 161, 271-279.
- Roelfsema, M.R.G. y R. Hedrich. 2002. Studying guard cell in the intact plant: modulation of stomatal movement by apoplastic factors. *New Phytol.* 153, 425-431.
- Rouse, D.T., R. Marotta y R.W. Parish. 1996. Promoter and expression on an *Arabidopsis thaliana* dehydrin gene. *FEBS Lett.* 381, 252-256.
- Schwartz, S.H., X. Qin y J.A. Zeevaart. 2003. Elucidation of the indirect pathway of abscisic acid biosynthesis by mutants, genes, and enzymes. *Plant Physiol.* 131, 591-601.
- Shao, H.B., L.Y. Chu, C.A. Jaleel y C.X. Zhao. 2008. Water-deficit stress-induced anatomical changes in higher plants. *C.R. Biol.* 331, 215-225.
- Shen, Q., P. Zhang y T.H. Ho. 1996. Modular nature of abscisic acid (ABA) response complexes: composite promoter units that are necessary and sufficient for ABA-induction of gene expression in barley. *Plant Cell* 8, 1107-1119.
- Shen, Y.Y., X.F. Wang, F.Q. Wu, S.Y. Du, Z. Cao e Y. Shang. 2006. The Mg-chelatase H subunit is an abscisic acid receptor. *Nature* 443, 823-826.
- Shinozaki, K. y K. Yamaguchi-Shinozaki. 1996. Molecular responses to drought and cold stress. *Curr. Opin. Biotechnol.* 7, 161-167.
- Shinozaki, K. y K. Yamaguchi-Shinozaki. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58(2), 221-227.
- Shinozaki, K., K. Yamaguchi-Shinozaki y M. Seki. 2003. Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* 6, 410-417.
- Skriver, K. y J. Mundy. 1990. Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress. *Plant Cell* 2, 505-512.
- Swire-Clark, G.A. y R.W. Marcotte. 1999. The wheat LEA protein *Em* functions as an osmoprotective molecule in *Sacharomyces cerevisiae*. *Plant Mol. Biol.* 39, 117-128.
- Sreenivasulu, N., V. Radchuk, M. Strickert, O. Miersch, W. Weschke y U. Wobus. 2006. Gene expression patterns reveal tissue-specific signaling networks controlling programmed cell death and ABA-regulated maturation in developing barley seeds. *Plant J.* 47, 310-327.
- Tabaeizadeh, Z. 1998. Drought-induced responses in plant cells. *Intl. Rev. Cyt.* 182, 193-245.
- Taiz, L. y E. Zeiger. 2006. *Plant Physiology*. 4th ed. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tamura, T., K. Hara, Y. Yamaguchi, N. Koizumi y H. Sano. 2003. Osmotic stress tolerance of transgenic tobacco expressing a gene encoding a membrane-located receptor-like protein from tobacco plants. *Plant Physiol.* 131, 454-462.
- Tarczynski, M.C., R.G. Jensen y H. Bohnert. 1992. Expression of a bacterial *mtlD* gene in transgenic tobacco leads to production and accumulation of mannitol. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 2600-2604.
- Tian, L., D. DellaPenna y J.A.D. Zeevaart. 2004. Effect of hydroxylated carotenoid deficiency on ABA accumulation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122(3), 314-320.
- Vasil, V., W.R.J. Marcotte, L. Rosenkrans, S.M. Cocciolone e I.K. Vasil. 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.
- Waditee, R., N.H. Bhuiyan, V. Rai, K. Aoki, Y. Tanaka, T. Hibino, S. Suzuki, J. Takano, A.T. Jagendorf, T. Takabe y T. Takabe. 2005.

- Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic-stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. PNAS 102(5), 1319-1323.
- Wang, Y., J. Jiang, X. Zhao, G. Liu, C. Yang y L. Zhan. 2006. A novel *LEA* gene from *Tamarix androssowii* confers drought tolerance in transgenic tobacco. Plant Sci. 171, 655-662.
- Wehner, F., H. Olsen, H. Tinel, E. Kinne-Saffran y R.K.H. Kinne. 2003. Cell volume regulation: osmolytes, osmolyte transport, and signal transduction. Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 148, 1-80.
- Xu, D., X. Duan, B.M. Wang, B. Hong, D.T.H. Ho y R. Wu. 1996. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice. Plant Physiol. 110, 249-257.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y K. Shinozaki. 1993. Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis* and analysis of its promoter in transgenic plants. Mol. Gen. Genet. 236, 331-340.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y K. Shinozaki. 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.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y K. Shinozaki. 2005. Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. Trends Plant Sci. 10, 88-94.
- Yamaguchi-Shinozaki, K. y K. Shinozaki. 2006. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. Annu. Rev. Plant Biol. 57, 781-803.
- Yancey, P.H., M.E. Clark, S.C. Hand, P.D. Bowlus y G.N. Somero. 1982. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. Science 217, 1214-1217.
- Zeevaart, J.A.D. y R.A. Creelmen. 1988. Metabolism and physiology of abscisic acid. Annu Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39, 439-473.
- Zhang, L., A. Ohta, M. Takagi y R. Imai. 2000. Expression of plant group 2 and group 3 *lea* genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins. J. Biochem. 127, 511-516.
- Zhang S.Q. y W.H. Outlaw. 2001. Abscisic acid introduced into the transpiration stream accumulates in the guard cell apoplast and causes stomatal closure. Plant Cell Environ. 24, 1045-1054.
- Zhu, J.K., K.S. Scumaker y L. Xiong. 2002. Cell signalling during cold, drought, and salt stress. Plant Cell 14, 165-183.
- Zonia, L. y T. Munnik. 2007. Life under pressure: hydrostatic pressure in cell growth and function. Trends Plant Sci. 12(3), 90-97.
- Zyalalov, A.A. 2004. Water flows in higher plants: physiology, evolution, and system analysis. Russ. J. Plant Physiol. 51(4), 547-555.