

BASES MOLECULARES DE LA RESISTENCIA A SEQUÍA EN PLANTAS

N C. García O., R. Trejo C., A. Pedroza S. F. Gómez L. J. H. Esparza M., y M. Sepúlveda B.

Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas. Bermejillo, Dgo.

RESUMEN. La sequía ha sido desde hace mucho tiempo una condición que afecta la producción de cultivos al igual que el crecimiento y desarrollo de las plantas que crecen en estado natural. Las plantas han adoptado mecanismos de resistencia a la sequía que pueden ser de carácter fisiológico, morfológico y molecular. El objetivo del presente trabajo fue hacer un análisis teórico de los genes asociados con tolerancia a la sequía que han sido descubiertos a la fecha, agruparlos por las funciones de las proteínas para las que codifican, hacer una discusión y síntesis de los mecanismos moleculares de la tolerancia a sequía en plantas. Se identificaron los genes de respuesta a sequía registrados en los bancos de datos Gen Bank, Suiz Prot y EMLB y se llevaron a cabo alineamientos de secuencias con el software BLAST versión 2.6.6 para identificar genes homólogos. Los genes asociados con tolerancia a sequía se agruparon de acuerdo a la función que realizan dentro de la planta en proteínas de protección, transporte de agua, transducción de señales, producción de osmolitos y antioxidantes. Se efectuaron análisis filogenéticos con las secuencias de las proteínas predichas de varios genes asociados a sequía con el empleo del paquete computacional MEGA versión 2.1. Se han registrado al menos 60 diferentes genes asociados con las respuestas a sequía en plantas, los cuales tienen acción en diferentes niveles de la cascada de señales desencadenadas por déficit hídrico. Las secuencias de los genes asociados a sequía tienen una alta homología en diferentes especies de plantas, sin embargo, la evolución de estos genes parece haber tenido diferentes vías.

Palabras clave:

SUMMARY. Drought is an environmental condition that has enormous effects on the growth and yield of cultivated and wild plants. However, plants have evolved several characteristics to deal with drought and water deficit. Those characteristics are either physiological, morphological, biochemical or molecular. The objective of this study was to carry out an analysis of information in literature and databases on drought-responsive genes and elaborate a synthesis of the molecular mechanisms of drought tolerance. All the drought-responsive genes registered in GenBank, Suiz Prot and EMLB databases were obtained. More than 60 unique drought-responsive genes were identified. Alignment analysis of the sequences was performed using BLAST ver. 2.6.6. The identified genes were grouped by the function of their predicted proteins into protection, water and ions transport, signal transduction, synthesis of compatible solutes, and antioxidants proteins. Phylogenetic analyses of eight genes were performed using MEGA version 2.1 software. The predicted products of the identified drought-responsive genes were found to act at different levels of the signal cascade triggered by water stress. The sequences of drought-responsive genes have a great homology in different species of plants. However, they may have evolved by diverse ways.

Key words:

INTRODUCCIÓN

El estudio de las zonas áridas y semiáridas es un tema de actualidad debido a que en esas regiones existen condiciones adversas para la producción y para sobrevivir, debido a las sequías.

Muchas especies vegetales han adoptando cambios fisiológicos, morfológicos y moleculares para tolerar el déficit hídrico. Los mecanismos moleculares han cobrado gran importancia en los últimos años, ya que se está logrando conocer el comportamiento básico de las plantas bajo estrés a través de la identificación y caracterización de los genes y familias de genes que están involucradas.

Los procesos de respuesta al déficit hídrico son iniciados dentro de las plantas que sufren un estrés hídrico u osmótico, para ajustar su metabolismo celular y evitar daños causados por la pérdida o deficiencia de agua. Takahashi *et al.* (2000), plantearon la hipótesis de que el estímulo del estrés hídrico es percibido por osmosensores y que posteriormente la señal es transferida al núcleo, lo que provoca un cambio en la expresión de varios genes por una vía compleja de transducción de señales, como es el aumento en segundos mensajeros (Ca^{2+} , Inositol 1,4-5 trifosfato, Fosforilación de proteínas, síntesis de ABA, etc.). En esas vías de transducción de señales el ácido abscísico (ABA) juega un papel muy importante. El ABA es una hormona vegetal que afecta muchos

procesos en la planta y que juega un papel muy importante en la respuestas de adaptación al estrés, maduración, dormancia y germinación de las semillas. También tiene funciones en la adaptación de las plantas al estrés ambiental, ya que se induce su síntesis y acumulación por los tejidos cuando se presenta un factor de estrés como el déficit hídrico, las bajas o las altas temperaturas o la salinidad. Se sabe que el ABA tiene una función determinante en las respuestas de la planta a un déficit hídrico ya que promueve el cierre estomático y acumulación de solutos en la raíz debido a una rápida alteración en el flujo de iones en las células guarda (Abe *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2002).

Se sabe que existen vías de transducción de señales que son dependientes de ABA y otras que son independientes de ABA. Los genes que son inducibles por deshidratación y que son dependientes de ABA, contienen elementos de respuesta a ABA, conocidos como ABREs (ABA responsive element). Estos elementos de ADN tienen una secuencia conservada de al menos 8 nucleótidos (PyACGTGGC) y se encuentran en la región de los promotores. Un ABRE funciona como un elemento de ADN *cis* actuante involucrado en la expresión de un gen regulado por ABA (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

Los ABRE se han identificado en muchos de los genes que son inducidos por estrés. Estos funcionan como un elemento de ADN *cis*, involucrado en la expresión de genes por ABA.; los ABREs fueron identificados primeramente en genes de frijol (*Em*) y arroz (*rab*), y la proteína que se une al ABRE-ADN es una proteína que contiene una región bZIP. La secuencia conservada, PyACGTGGC, ha sido reportada como un elemento que funciona uniendo factores de transcripción específicos en muchos genes que responden a ABA (Abe *et al.*, 1997; Ascenzi y Gantt, 1999).

Por otro lado, las vías ABA-independientes están involucradas en la expresión de genes que responden a déficit hídrico y bajas temperaturas. Esta es una vía común de transducción de señales entre el estrés por frío y deshidratación, lo cual involucra elementos de ADN *cis*-actuantes y vías de transducción de señales adicionales que funcionan por deshidratación o frío (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 2000). Los DRE (dehydration responsive element) son elementos *cis* actuantes que responden a la deshidratación. También se ha reportado otro elemento *cis* actuante llamado CRT que responde a bajas temperaturas. Los elementos DRE/CRT están involucrados en la expresión de genes que responden a bajas temperaturas y deshidratación (Nakashima *et al.*, 2000). La secuencia conservada de 9 pb (TACCACAT) en el DRE es esencial para la regulación de la inducción de un gen bajo condiciones

de sequía, baja temperatura y alto contenido de sales. Los DRE unen proteínas específicas (factores de transcripción) en regiones altamente conservadas (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

Los segundos mensajeros pueden estar involucrados en la activación de proteínas que interactúan con el ADN para la transcripción de genes inducidos por el déficit hídrico. El Ca²⁺ y el IP₃ son los candidatos mas probables como segundos mensajeros en las respuestas al déficit hídrico de las células vegetales (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

Los genes que responden a sequía y/o sus productos se pueden clasificar en varios grupos dependiendo de su función específica, en un grupo se encuentran aquellos que codifican para proteínas que probablemente tienen una función en la tolerancia al estrés (proteínas canales de agua involucradas en el movimiento de agua a través de las membranas, enzimas requeridas para la biosíntesis de varios osmoprotectores, azúcar, prolina y glicina betaina). Un segundo grupo esta formado por genes que codifican proteínas que pueden proteger macromoléculas y membranas (proteínas LEA, osmotina, proteínas anticongelantes, chaperonas y proteínas ligadoras de mRNA). En otro grupo se incluyen a las proteasas para desdoblar proteínas (tiol proteasas, proteasa Clp y ubiquitina), y proteínas que participan en la detoxificación de enzimas (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1997). Estos genes han sido caracterizados plenamente en sus regiones reguladoras y codificadoras, inclusive algunos de ellos ya han sido empleados en la transformación génica.

Una de las clases o grupos con mayor número de genes conocidos es el de antioxidantes. Esto se puede considerar normal dado que varios tipos de estrés provocan a su vez un estrés oxidativo. La sequía, las heladas, las altas temperaturas, la salinidad, el ataque de patógenos y plagas pueden provocar un incremento de las partículas reactivas de oxígeno (ROS) que entre otros efectos causan la peroxidación de los lípidos de membrana. La peroxidación de lípidos altera el funcionamiento correcto de las membranas y en consecuencia la vida de las células. Varios compuestos conocidos como antioxidantes se acumulan en la presencia de algunos de los factores de estrés arriba mencionados (Buchanan *et al.*, 2001).

La información sobre las bases moleculares de la tolerancia a sequía se ha incrementado significativamente en los últimos tiempos. Sin embargo, esa información se encuentra dispersa en diversas fuentes de información científica. El conocimiento de las respuestas moleculares de las plantas al déficit hídrico o la sequía posibilita generar estrategias para

mejorar las plantas cultivadas con el propósito de producir mejores rendimientos en condiciones de baja disponibilidad de humedad y con un uso eficiente del agua. Por esta razón, en este trabajo se hace un análisis y síntesis de la información sobre las bases moleculares de la tolerancia a sequía en plantas, tomando como base la información bibliográfica actual y la información existente en los bancos de datos internacionales sobre los genes asociados con el déficit hídrico.

MATERIALES Y METODOS

Banco de datos

Se revisó información bibliográfica actualizada sobre los mecanismos de resistencia a la sequía en las plantas, con especial énfasis en las bases moleculares de la resistencia a sequía. Posteriormente se obtuvo información de bancos de datos internacionales acerca de genes, y sus productos, asociados con la tolerancia a sequía. Particularmente, se utilizó la base de datos GenBank. Las unidades de registro consisten en secuencias de ARN, ADN o aminoácidos con anotaciones.

Genes asociados con tolerancia a sequía

La información inicialmente obtenida se resumió, identificando todos los diferentes genes asociados con tolerancia a sequía que han sido reportados en GenBank. En la búsqueda realizada en el NCBI se encontró un total de 2558 genes o fragmentos de genes asociados con la tolerancia a sequía en plantas, los cuales codifican para 66 polipéptidos. Ocho genes presentes con mayor frecuencia en el GenBank fueron incluidos en un estudio de alineamientos con el paquete computacional BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) versión 2.6.6. disponible en el sitio del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). En los resultados del BLAST para cada gen, se identificaron aquellos con mayores calificaciones de alineamiento o similitud (S). El otro criterio para seleccionar las secuencias con mayor homología fue el valor de *E*. Las secuencias con alineaciones con valores de *E* mas cercanos a cero fueron las seleccionadas por ser esas alineaciones significativas.

Análisis filogenético

Secuencias seleccionadas, fueron sometidas a un análisis filogenético. Para llevar esos análisis, las secuencias de productos de genes asociados con la tolerancia a sequía que presentaron la mayor similitud se ingresaron en el paquete computacional MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis) (Kumar *et al.*, 2001). En el análisis filogenético se emplearon los métodos UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) y de Máxima parsimonia (MP). La

evaluación de los árboles filogenéticos obtenidos por los dos diferentes métodos se llevó a cabo con una prueba de robustez (bootstrapping). Finalmente, con los datos obtenidos a través del proceso se llevó a cabo una agrupación de algunos genes asociados con tolerancia a sequía de acuerdo a las funciones de sus productos y se les ubicó en la cascada de transducción de señales que ocurren por la presencia de déficit hídrico en las plantas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los bancos de datos del NCBI y del EMLB tenían reportados, hasta octubre de 2003, un total de 2558 genes o fragmentos de genes asociados con la tolerancia a sequía en plantas. Varios de esos genes o fragmentos de genes codifican para un solo polipéptido. Así, el total de genes o fragmentos de genes registrados en los bancos de genes codifican para 66 diferentes proteínas. En promedio 36 clones codifican para una misma proteína, sin embargo el número real varía mucho dependiendo de la proteína de que se trate.

Ramanjulu y Bartels (2002) hacen una clasificación de genes o productos de genes asociados con la tolerancia a la sequía en plantas. Estos autores muestran 6 diferentes grupos: (1) Acumulación de osmolitos (prolina, azúcares); (2) Protección (LEAs, chaperonas, dehidrinas), (3) Incremento de antioxidantes, (4) Proteínas de las membranas (aguaporinas y proteínas de transporte); (5) Modificaciones anatómicas (incremento en el grosor de la cutícula); (6) Reducción en el crecimiento. Tomando como base la clasificación anterior, la agrupación de los genes de acuerdo a la función de sus productos se hizo en once clases, ya que se incluyeron grupos diferenciales por sus funciones (Cuadro 1).

Los genes de LEAs, aguaporinas, galactinol sintetasa, colina monooxigenasa, betaina aldehído deshidrogenasa, trehalosa sintetasa, fosfolipasa D y pirrolina 5 carboxilasa fueron seleccionados para llevar a cabo análisis filogenéticos. Aquí se muestran los resultados de los cinco primeros.

Proteínas Abundantes de la Embriogénesis Tardía (LEAs)

Las LEAs o dehidrinas son proteínas que se acumulan en etapas tardías de desarrollo en muchas plantas, también se acumulan en las partes vegetativas como una respuesta al estrés osmótico y a la aplicación de ABA, lo que ha hecho pensar que las LEAs tienen un importante papel en la protección de las estructuras celulares durante el déficit hídrico (Siddiqui *et al.*, 1998; Colmenero-Flores *et al.*, 1999). Las proteínas LEA se acumulan durante la etapa tardía de desarrollo del

Cuadro 1. Clasificación de algunos genes asociados a tolerancia a sequía y la posible función de la proteína para la que codifican.

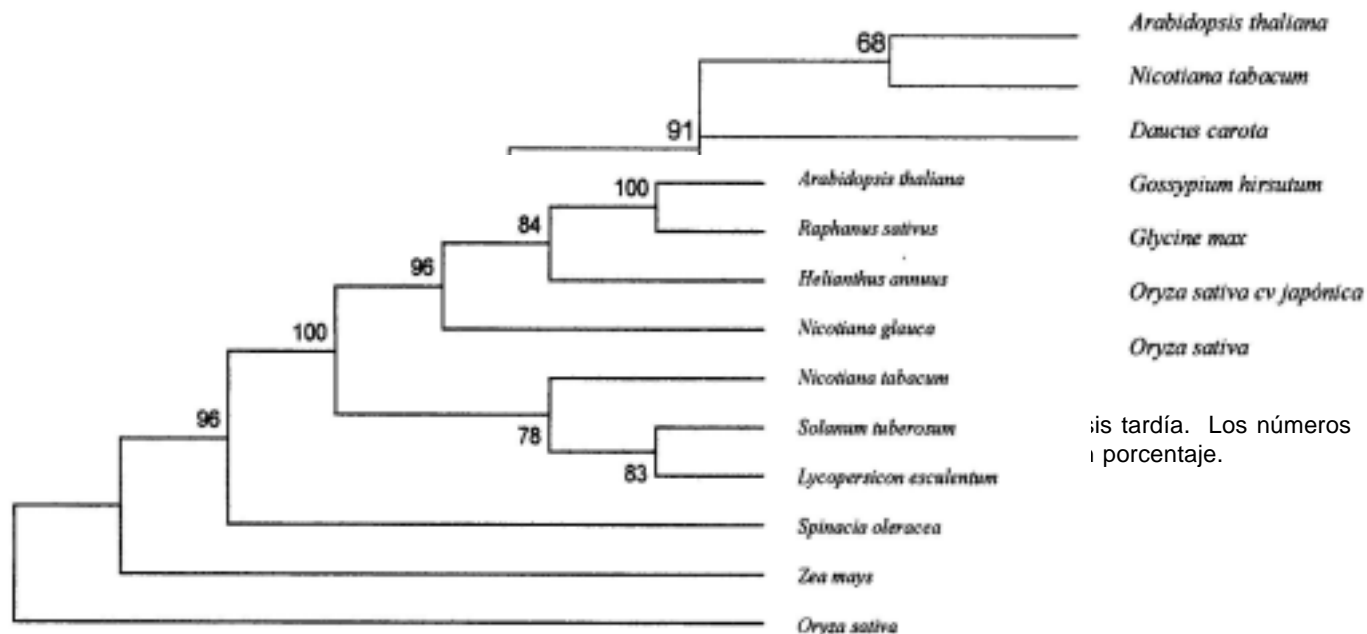
embrión. Estas proteínas pueden tener una función esencial en la adaptación de las semillas a deshidratación extrema (Carles *et al.*, 2002).

El algoritmo de alineamiento utilizado por el programa BLAST, permitió identificar la existencia de 240 LEAs en diferentes organismos. Las 240 LEAs encontradas pertenecen tanto a plantas como animales. Un total de 52 LEAs correspondieron a organismos vegetales, de los cuales *Arabidopsis* es la que se encuentra en mayor número con 35 genes o fragmentos de genes registrados en el GenBank, alfalfa con 7, frijol con 4, arroz con 3, cebolla con 2 y tabaco con 1. El grado de homología fue medido por el número de Bits y el valor de E. Los valores de E indican que todas las secuencias tienen una alta homología lo que indica que hay grandes regiones conservadas de esas proteínas. El análisis filogenético muestra una clara separación de las gramíneas con respecto a un grupo mayor de dicotiledóneas (Figura 1). Todas estas LEAs tienen una gran homología y poseen grandes regiones conservadas.

Aguaporinas

Las aguaporinas son canales de agua que pueden facilitar el paso del agua a través de las membranas biológicas. Estas proteínas pertenecen a la familia del grupo mayor de proteínas Integrales (MIP), presente en todos los reinos (Maurel, 1997). Estas proteínas son acumuladas en aquellas plantas que están expuestas a ambientes secos. En las plantas, las aguaporinas se han localizado en el tonoplasto (TIP; Tonoplast Intrinsic Protein) y la plasmamembrana (PIP; Plasmamembrane Intrinsic Protein). En estudios realizados en tabaco y maíz se han encontrado altos niveles de aguaporinas en el tonoplasto lo cual indica que pueden jugar un papel muy importante en el ajuste osmótico celular (Sarda *et al.*, 1999; Maurel, 1997).

Al utilizar la secuencia de una aguaporina de girasol para llevar a cabo un análisis BLAST, se encontró que hay registros de al menos 105 organismos que presentan secuencias con algunas similitudes a la original; 60 aguaporinas pertenecen a organismos vegetales, de los



is tardía. Los números
i porcentaje.

Figura 2. Árbol filogenético para aguaporinas. Los números representan el valor de la prueba de remuestreo (bootstrap) en porcentaje.

cuales *A. thaliana* tiene registrado el mayor número con 32, maíz con 6, girasol con 2, tabaco y alfalfa con 4,, nabo con 3, trigo y papa con 2, arroz, cebada, vid, cebolla, espinaca y chile con 1. Todas las secuencias analizadas mostraron homología significativa, con valores de E muy bajos. El árbol filogenético de las aguaporinas muestra la evolución del gen en varias especies vegetales (Figura 2). El gen parece haber divergido en gramíneas *Oryza sativa* y *Zea mays* antes que en brassicáceas o solanáceas, cuyas especies analizadas quedaron ubicadas en dos grupos claramente distintivos.

Galactinol sintetasa

La acumulación de galactinol y RFO se ha observado durante la maduración de la semilla en *Arabidopsis*, frijol y maíz, por lo que se deduce una función importante de este azúcar en la tolerancia a la desecación y maduración de las semillas. Estudios realizados en algunas plantas muestran que plantas expuestas a sequía, salinidad y frío acumulan galactinol y rafinosa, lo que sugiere que están involucrados en la tolerancia al estrés en plantas expuestas a estrés abiótico así como en la maduración de las semillas (Taji *et al.*, 2002). La secuencia de galactinol sintetasa se sometió al análisis BLAST. Con ello se encontró que existen 100 organismos reportados con Galactinol sintetasa, de los cuales solamente 43 pertenecen a especies vegetales. El mayor número de genes reportados pertenece a *Arabidopsis thaliana* con 25, 9 para *Oryza sativa*, 3 para *Pisum sativum*, 2 para *Cucumis melo*, y con 1 *Cucumis sativus*, *Hordeum vulgare*, *Brassica oleracea* y *Lycopersicon esculentum*. El análisis filogenético muestra que este gen puede haber

tenido diferentes vías evolutivas, ya que especies muy emparentadas como *Cucumis sativus* y *Cucumis melo* son ubicadas en grupos diferentes (Figura 3). Otra posible explicación es que realmente las seis especies que conforman los dos grupos mayores pertenezcan a un mismo grupo, aunque el valor de confianza del remuestreo es muy alto (93%).

Colina Monoxigenasa (CMO)

La colina monoxigenasa (CMO) cataliza un paso en el sistema de la biosíntesis de glicina betaina, un soluto compatible que se acumula en muchas plantas en respuesta a salinidad y sequía. La ingeniería metabólica de acumulación de osmoprotectores ha puesto gran interés en encontrar diferentes vías que provean a los cultivos resistencia a cierto tipo de estrés. Una de las vías es la síntesis de glicina betaina (GB) un potente osmoprotector que se acumula durante la floración de las plantas. Los niveles de mRNA de CMO y la actividad enzimática se incrementa 3 a 5 veces en plantas bajo estrés hídrico (Russell *et al.*, 1998). El análisis de BLAST permitió identificar 113 organismos vegetales con secuencias registradas de CMO o con homología a CMO, de los cuales *A. thaliana* cuenta con 5 registros, *Atriplex* y espinaca con 2, *Suaeda*, *Beta vulgaris* y *Amaranthus* con 1. El análisis filogenético separó claramente cuatro subgrupos en los que destacan el subgrupo conformado por las especies de *Atriplex* y el subgrupo conformado por *Amaranthus tricolor* y *Suaeda liaotungensis*. La divergencia del gen colina monooxigenasa en estos dos grupos es mucho más reciente que la que existe entre estos y *Arabidopsis thaliana*. En esta especie, por lo tanto, el gen puede ser ancestral (Figura 4).

Figura 3. Árbol filogenético para galactinol sintetasa. Los números representan el valor de la prueba de remuestreo (bootstrap) en porcentaje.

Figura 4. Árbol filogenético para colina monooxigenasa. Los números representan el valor de la prueba de remuestreo (bootstrap) en porcentaje.

Betaina Aldehído Deshidrogenasa (BADH)

La Betaina Aldehído Deshidrogenasa (BADH) participa en uno de los pasos de la síntesis de glicina betaina que es un osmoprotector vegetal. Es la enzima que cataliza la segunda etapa en la síntesis de glicina-betaina (Livingstone *et al.*, 2003). Las plantas sintetizan glicina-betaina vía oxidación de la colina en dos pasos. El primer paso es catalizado por la CMO, la cual produce la forma hidratada de la betaina-aldehído. El segundo paso es mediado por la enzima BADH. Para estos

vegetales con secuencia muy similar a la original, de las cuales *Arabidopsis* cuenta con 16 repeticiones, *atriplex* con 7, arroz con 5, espinaca con 4, amaranto, *Pisum sativum* y sorgo con 2 y nabo, espinaca y sorgo con 1. El análisis filogenético muestra que este gen parece ser ancestral en monocotiledóneas y al parecer divergió más recientemente en dicotiledóneas, ya que estas últimas conforman grupos claramente definidos. Sin embargo, la presencia de una de las especies de *Atriplex* fuera del grupo pudiera ser un significativo ejemplo de migración y especiación de las diferentes vías aldehído deshidrogenasa

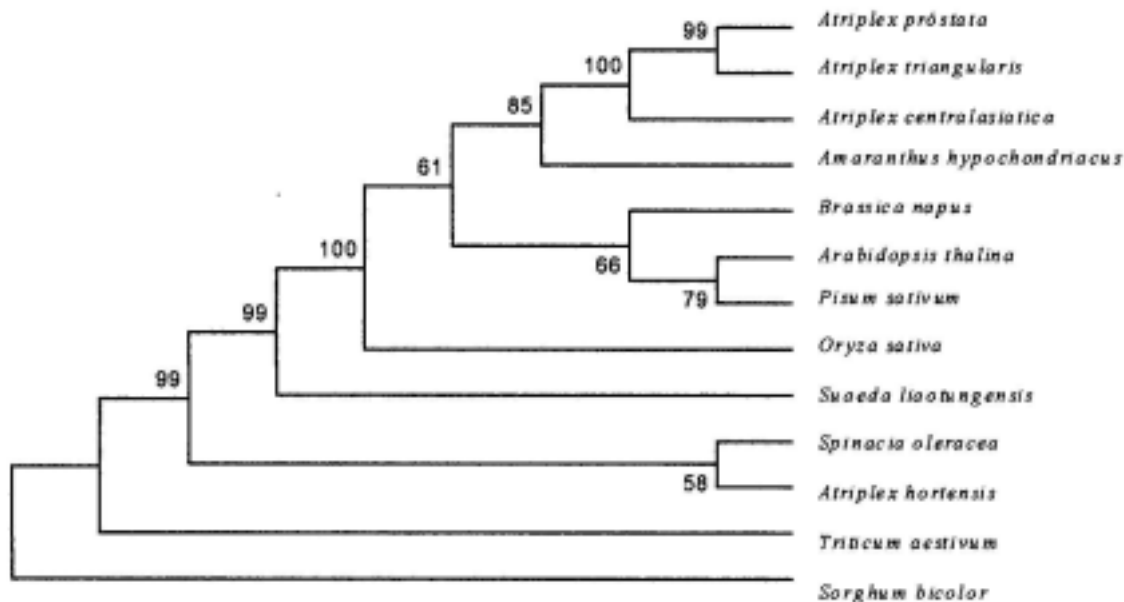


Figura 5. Árbol filogenético para betaina aldehído deshidrogenasa. Los números representan el valor de la prueba de remuestreo (bootstrap) en porcentaje.

Figura 9. Funcionamiento de las cascadas de señales que se originan por el déficit hídrico en las plantas (Modificado de Shinozaki y Yamaguchi Shinozaki, 1997).

Traducción de señales

Los resultados de este trabajo permiten afirmar que los productos de los genes identificados en las bases de datos están involucrados en varios aspectos de la cascada de señales que se origina por el déficit hídrico en una sequía. En la Figura 6, se muestra el funcionamiento de las diferentes cascadas de señales así como las proteínas que se han identificado y su participación en la percepción del estímulo, en la recepción de señales químicas como el ABA, en la transducción de la señal como segundos mensajeros, en la activación de factores de transcripción, en el control de la transcripción de genes asociados a tolerancia a sequía y por supuesto en la síntesis de compuestos de respuesta a la sequía, como son los osmolitos, lípidos de membrana y de cutícula, transportadores de iones y agua, proteínas de protección, antioxidantes.

CONCLUSIONES

Se confirma la naturaleza poligénica de la tolerancia a sequía en plantas, en las que se identifican por lo menos 70 diferentes genes que participan en esta característica. Los productos de los genes identificados en las bases de datos están involucrados varios aspectos de la cascada de señales que se origina por el déficit hídrico en una sequía.

Los elementos de ADN que responden a ABA (ABREs) y los elementos que responden a la deshidratación (DREs) juegan un papel muy importante en la respuesta molecular de las plantas al déficit hídrico. Estos elementos tienen regiones conservadas muy características que les permiten asociarse con factores de transcripción que son activados por el déficit hídrico. Los factores de transcripción, en consecuencia, pueden ser una herramienta muy valiosa para el mejoramiento de plantas para tolerancia a sequía mediante la ingeniería genética.

Las secuencias de los genes asociados a sequía tienen una alta homología en diferentes especies de plantas, sin embargo, la evolución de estos genes parece haber tenido diferentes vías evolutivas, lo que significa que las características asociadas con la tolerancia a sequía son complementarias y que no necesariamente han evolucionado al mismo ritmo en especies emparentadas.

LITERATURA CITADA

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

- Ascenzi, R. y Grantt, S.J. 1999. Molecular genetic analysis of the drought inducible linker histone variant in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 41:159-169
- Buchanan, B.B.; Gruissem, W. y Jones, R.L. 2000. *Biochemistry & molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologist.
- Carles, C.; Bies-Etheve, N.; Aspart, L.; Leon-Kloosterziel, K. M.; Koornneef, M.; Echeverria, M. y Delseny, M. 2002. Regulation of *Arabidopsis thaliana* Em genes: role of AB15. *the plant Journal*. 30(3): 373-383
- Colmenero-Flores, J.M.; Moreno, L.P.; Smith, C.E y Covarrubias, A. A. 1999. Pvlea-18, a member of a new late embryogenesis abundant protein family that accumulates during water stress and in the growing regions of well irrigated bean seedlings. *Plant Physiology* 120:93-103
- Kang, J.; Choi, H.; Im, M. y Kim, S. Y. 2002. *Arabidopsis* Basic Leucine Zipper Proteins that Mediate Stress-Responsive Abscisic Acid Signaling. *Plant Cell* 14 (2): 343-357
- Kiegle, E.; Moore, C.A.; Haseloff, J.; Tester, M.A. y Knight, M.R. 2000. Cell type specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *The Plant Journal* 23(2):267-278
- Kumar, S.; Tamura, K.; Jakobsen, I. B.; y Nei, M. 2001. MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, Arizona State University, Tempe, Arizona, USA
- Livingstone, J. R.; Maruo, T.; Yoshida, I.; Tarui, Y.; Hirooka, K.; Yamamoto, Y.; Tsutui, N. y Hirasawa, E. 2003. Purification and properties of betaine aldehyde dehydrogenase from *Avena sativa*. *Journal Plant Res.* 116(2):133-140
- Maurel, C. 1997. Aquaporins and water permeability of plant membranes. *Plant Physiol, Plant Mol Biol* 48:399-429
- Nakashima, K.; Shinwari, Z.K.; Sakuma, Y.; Seki, M.; Miura, S.; Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. 2000. Organization and expression of two *Arabidopsis* DREB2 genes encoding DRE-binding proteins involved in dehydration and high salinity responsive gene expression. *Plant Molecular Biology*. 42:657-665.
- Ramanjulu, S. y Bartels, D. 2002. Drought and desiccation induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell and Environment* 25:141-151.
- Russel, B. L.; Rathinasabapathi, B. y Hanson, A. D. 1998. Osmotic stress induces expression of choline monooxygenase in sugar beet and *Amaranth*. *Plant Physiol* 116:859-865
- Sarda, X.; Tusch, D.; Ferrare, K.; Cellier, F.; Alcon, C.; Dupuis, J. M.; Casse, F. y Lamaze, T. 1999. Characterization of closely related TIP genes encoding aquaporins which are differentially expressed in sunflower roots upon water deprivation through exposure to air. *Plant Molecular Biology* 40:179-191.
- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (1997) Gene expression and signal transduction in Water-Stress response. *Plant Physiol* 115:327-334

- Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K. (2000) Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and cross-talk between two stress signaling pathways
- Siddiqui, N. U.; Chung, H. J.; Thomas, T. L y Drew, M.C. 1998 Abscisic acid dependent and independent expression of the carrot late embryogenesis abundant class gene Dc3 in transgenic tobacco seedlings. *Plant Physiol.* 118:1181-1190
- Taji, T.; Oshumi, Ch.; Iuchi, S.; Seki, M.; Kasuga, M.; Kobayashi, M.; Yamaguchi, K. y Shinozaki, K. 2002. Important Roles of drought and cold inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The plant Journal* 29(4):417-426
- Takahashi, S.; Katagiri, T.; Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. 2000. An *Arabidopsis* gene encoding a Ca binding protein is induced by Abscisic Acid during Dehydration. *Plant Cell Physiol.* 41(7): 898-903.