

**L. Chávez Suárez y R. Ramírez Fernández**

**MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN PLANTAS  
AFECTADAS POR SALINIDAD Y SEQUÍA**

Separata ITEA

INFORMACIÓN TÉCNICA ECONÓMICA AGRARIA, VOL. **106** N.º 3 (157-169), 2010

## Mecanismos de transducción de señales en plantas afectadas por salinidad y sequía

L. Chávez Suárez y R. Ramírez Fernández

Instituto de Investigaciones Agropecuarias "Jorge Dimitrov", Carretera Vía Manzanillo Km 17, Bayamo. Granma, Cuba. E-mail: lchavez@dimitrov.cu

### Resumen

La salinidad y la sequía afectan considerablemente la productividad de los cultivos a escala global. La señalización de estos fenómenos en las plantas, es un proceso complejo que involucra diferentes vías y moléculas señalizadoras. En el presente trabajo se describen algunos mecanismos de transducción de señales de las plantas frente a estos tipos de estrés abiótico.

**Palabras clave:** vías transducción de señales, estrés abiotico, CDPK, MAPK.

### Summary

#### Signalling pathway in plants affected by salinity and drought

Salinity and drought affects considerably the crop productivity at world level. The signalling of these phenomena in plants, is a complex process that involucrate different pathways an signalling molecules. Some mechanisms of plant signal transduction are described in this paper against these types of abiotic stress.

**Key words:** signal transduction pathway, abiotic stress, CDPK, MAPK.

### Introducción

La sequía y la salinidad son dos de las causas fundamentales de las pérdidas de las cosechas a nivel mundial. Al igual que otros organismos vivos, las plantas han desarrollado maquinarias de señalización sofisticadas para adaptar su metabolismo celular al medio ambiente cambiante. De hecho, debido a su ciclo de vida sésil, las plantas pueden responder y protegerse a sí mismas de todas las formas de estrés abiótico. Se ha demostrado la activación de numerosas vías de transducción de señales en respuesta al estrés abiótico (Nakashima *et al.*, 2009).

El estrés se percibe primero a través de los receptores presentes en la membrana de las células vegetales (Lorenzo *et al.*, 2009). La señal es entonces transducida hacia el interior de la célula, y esto conduce a la generación de segundos mensajeros que incluyen el calcio, las especies reactivas del oxígeno (ROS) y el inositol fosfato. Estos segundos mensajeros, posteriormente modulan los niveles de calcio intracelular. Estas variaciones en los niveles de calcio intracelular son detectadas por proteínas que unen calcio, también llamadas sensores de calcio. Estos cambian su estructura de forma calcio dependiente e inician una cascada de fosfori-

lación y marcan los principales genes de respuesta al estrés o los factores de transcripción que controlan dichos genes (Klimecka y Muszynska, 2007). Los productos de estos genes conducen a la adaptación de la planta a condiciones desfavorables. Los cambios inducidos por el estrés en la expresión genética participan en la generación de hormonas tales como el ABA, el ácido salicílico y el etileno. Estas moléculas pueden amplificar la señal inicial e iniciar una segunda vuelta de señalización que pueden seguir la misma vía o utilizar diferentes componentes en la vía de señalización. Ciertas moléculas, llamadas también moléculas accesorias pueden no participar directamente en la señalización sino en la modificación o ensamblaje de otros componentes. Estas proteínas incluyen, modificadores de proteínas, que pueden realizar modificaciones postraduccionales tales como miristoilación, glicosilación, metilación y ubiquitinación (Mahajan y Tuteja, 2005).

Se han descrito varias vías de transducción de señales del estrés abiótico, y específicamente la salinidad y la sequía, entre las que se destacan la vía SOS (*salt over sensitive*), la vía de las CDPKs (*calcium dependent protein kinase*), la vía de las MAPKs (*mitogen activated protein kinase*) (Zhou *et al.*, 2007). También se ha descrito la señalización mediada por fosfolípidos. El objetivo de este trabajo es describir brevemente algunas vías de transducción de señales en plantas afectadas por la salinidad y la sequía, así como hacer referencia al papel de calcio como segundo mensajero y la regulación de los genes de respuesta al estrés por factores de transcripción.

### **Papel del calcio en la respuesta de la planta al estrés abiótico**

El papel del ión  $\text{Ca}^{2+}$  en la respuesta de las plantas a estrés abiótico resulta esencial, por su papel señalizador, su función estruc-

tural en la membrana y su efecto sobre la actividad de algunos transportadores iónicos (Klimecka y Muszynska, 2007). Es, además, un segundo mensajero involucrado en la transducción de la señal del ABA. La señalización del calcio se modula por concentraciones específicas del catión (por ejemplo, patrones en la amplitud, duración, localización y frecuencia de los picos de calcio) en respuesta a diferentes estímulos. Estos cambios en los niveles de calcio son detectados por diferentes sensores, para transducir la señal mediada por el catión en eventos posteriores de la respuesta de la planta al estrés (Zhu *et al.*, 2007). Las plantas constan de numerosas clases de proteínas sensoras de  $\text{Ca}^{2+}$ , incluyendo la calmodulina y las proteínas relacionadas, proteínas *calcineurina B-like* (CBL) y proteínas quinasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (CDPK).

Un proceso celular mediado por el  $\text{Ca}^{2+}$  en el citoplasma o en el núcleo, comienza con la generación señal específica de la variación en su concentración, por una actividad sincronizada de canales, bombas y transportadores. Los cambios en el nivel citosólico de  $\text{Ca}^{2+}$  libre son detectados por un conjunto específico de proteínas sensoras de  $\text{Ca}^{2+}$ . La primera clase de sensores sin ningún dominio de respuesta (por ejemplo, la calmodulina y las proteínas semejantes a la calcineurina B), se une al calcio y logra cambios conformacionales que, en cambio, regulan la actividad y la función de disímiles proteínas blanco o regulan la expresión de determinados genes. Tales sensores se denominan sensores relay. Los sensores de un segundo grupo se llaman "responders", pues presentan dominios efectores (por ejemplo las proteínas quinasas) a través de los cuales ellos activan sus blancos (Reddy y Reddy, 2004). El motivo estructural *EF-hand* es el sensor predominante de calcio. Este es altamente conservado y cuenta con 29 aminoácidos y una estructura hélice-lazo-hélice, la que asemeja a una mano. El lazo

consta de 12 residuos conservados que unen al ion  $\text{Ca}^{2+}$ , lo que provoca cambios conformacionales que conllevan a la exposición de paquetes hidrofóbicos, los que, en cambio, facilitan la interacción de la proteína con otras proteínas. La presencia del motivo *EF-hand* en las proteínas incrementa su estabilidad y su afinidad por el ion calcio (Klimecka y Muszynska, 2007).

Se han informado la participación del calcio en numerosos eventos de respuesta de la planta al estrés abiótico por ejemplo, la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  puede reducir la magnitud del efecto negativo de la salinidad en el crecimiento, fenómeno que se ha atribuido al efecto estabilizador de la membrana y al mantenimiento de su capacidad selectiva (Marschner, 1995). El  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular podía reducir la pérdida de  $\text{K}^+$  inhibiendo los canales de salida KORC (Murata *et al.*, 2000), y disminuir la entrada de  $\text{Na}^+$  mediante la inhibición de canales KIRC y sobre todo VIC (Maathuis y Amtmann, 1999). Por otra parte, el  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular tendría un papel no menos esencial en la absorción de  $\text{K}^+$  y la selectividad  $\text{K}^+/\text{Na}^+$  en condiciones salinas mediante la modulación de otros transportadores iónicos como SOS1 (Zhu, 2000). La expresión del gen *SOS1* es dependiente del complejo SOS2/SOS3, donde SOS2 es una proteína quinasa y SOS3 es una proteína sensora de  $\text{Ca}^{2+}$  (Hussain *et al.*, 2008). Este aspecto será analizado más detalladamente en un epígrafe posterior. Se conoce que el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  es complejo, ya que actúa como intermediario en la cascada de señales que conducen a la transcripción de numerosos genes involucrados en la respuesta adaptativa (Chinnusamy *et al.*, 2005).

### Mecanismos de transducción de señales en plantas

#### Vía SOS

La regulación de la homeostasis iónica celular durante el estrés salino es crucial para la

tolerancia de las plantas a la salinidad. Como se plantea anteriormente una de las respuestas de las plantas frente a la salinidad y la sequía, es un incremento transitorio del  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico y la consiguiente activación de la expresión y/o actividad de proteínas sensoras de  $\text{Ca}^{2+}$ . La identificación de la vía SOS en *Arabidopsis thaliana* reveló componentes y mecanismos involucrados en la respuesta de la planta al estrés iónico. Análisis moleculares diferentes de mutantes sos de *Arabidopsis* condujeron a la identificación de componentes (SOS1, SOS2 y SOS3) de la vía que transduce una señal de estrés inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  para restablecer la homeostasis iónica celular (Bargmann *et al.*, 2009).

El componente SOS3 es un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  esencial para transducir la señal de estrés inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  y para la tolerancia a la salinidad de *Arabidopsis*. SOS3 codifica una proteína que une  $\text{Ca}^{2+}$  con un motivo estructural de N-miristoilación y tres dominios *EF-hand* que unen  $\text{Ca}^{2+}$ . La secuencia aminoacídica de SOS3 mostró una semejanza significativa con la subunidad reguladora de la calcineurina de levaduras y sensores de  $\text{Ca}^{2+}$  neuronales. Una mutación que reduce la capacidad de SOS3 de fijar  $\text{Ca}^{2+}$ , rinde mutantes hipersensibles a la salinidad; este defecto pudo ser parcialmente salvado por la adición de elevados niveles de  $\text{Ca}^{2+}$  al medio de crecimiento. La afinidad con que SOS3 une  $\text{Ca}^{2+}$  es menor comparada con otras proteínas que unen  $\text{Ca}^{2+}$  tales como la caltractina y la calmodulina (Ishitani, *et al.*, 2000).

La búsqueda de determinantes para la tolerancia a la salinidad también condujo a la identificación del locus SOS2 que codifica una serin-treonin-proteín quinasa, con un dominio quinasa catalítico N-terminal similar al SNF1/AMPK y un único dominio c-terminal regulador. En condiciones celulares normales, ambos dominios interactúan uno con otro, probablemente impidiendo la fosforilación del sustrato, bloqueando la entra-

da del mismo al centro activo. En presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , SOS3 activa la quinasa SOS2. El motivo estructural FISL en el dominio regulador de SOS2 es necesario y suficiente para la interacción con SOS3 y la delección de este motivo activa constitutivamente la quinasa SOS2. El cambio de la treonina 168 en el dominio quinasa, por el ácido aspártico también condujo a la producción de una quinasa SOS2 constitutivamente activa. La sobreexpresión de la forma activa de SOS2 bajo el control del promotor CaMV35S, rescata el fenotipo sensible a la salinidad tanto de SOS2 y SOS3, sosteniendo la idea de que ambas funcionan en la misma vía señalizadora de  $\text{Ca}^{2+}$  durante el estrés salino (Chinnusamy et. al., 2004).

El primer blanco de la vía SOS3-SOS2 se identificó mediante análisis genético molecular de los mutantes *sos1* en *Arabidopsis*. Al igual que *sos2* y *sos3*, el *sos1* es hipersensible a la salinidad y los tres mutantes acumulan mayores niveles de sodio que los encontrados en las plantas nativas. Se concluyó que SOS1 codifica un intercambiador (antiporter)  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática, con una porción citoplasmática bien larga. El complejo quinasa SOS3-SOS2 parece que controla tanto la expresión como la actividad de SOS1. Durante el estrés salino los niveles de transcritos de SOS1 disminuyen en mutantes *sos3* y *sos2*. Se ha demostrado que el complejo quinasa SOS3-SOS2 fosforila directamente a SOS1 (Vijayan et al., 2009).

La miristoilación de SOS3 es crucial para la tolerancia a la salinidad, pues cuando esta región sufre una mutación (G2A) se produce una hipersensibilidad a la salinidad. Esto se debe posiblemente a que la miristoilación constitutiva de SOS3 permite reclutar a SOS2 hacia la membrana plasmática, acercándolo a su blanco SOS1. Otros estudios en los cuales la vía SOS fue funcionalmente reconstituida en *Sacharomyces cerevisiae*, demuestran también que la señal del estrés

salino inducida por calcio se transduce por el complejo quinasa SOS3-SOS2 para activar SOS1 y reestablecer la homeostasis iónica. También se sugiere que el eflujo de  $\text{Na}^+$  que experimentan las células de la raíz durante el estrés salino puede mejorar por la activación de SOS1 por el complejo SOS3-SOS2 y que SOS1 probablemente también recupera el  $\text{Na}^+$  a partir del xilema, por lo que evitan el exceso de este mineral en el tallo (Chinnusamy et. al., 2004).

Se han encontrado otros blancos de la vía SOS. Por ejemplo, en *Arabidopsis* la entrada de  $\text{Na}^+$  dentro de las células de la raíz durante el estrés salino ocurre mediada por AtHKT1, un transportador de  $\text{Na}^+$  de baja afinidad. La mutación *atkt1* suprime la mutación *sos3*, lo que sugiere que el complejo quinasa SOS3-SOS2 puede prevenir el influjo de  $\text{Na}^+$ , inactivando la proteína HKT1 o inhibiendo la expresión del gen HKT1 durante el estrés salino. Además la actividad del antiporter vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  pudiera ser activada por la vía SOS3-SOS2. Las evidencias disponibles sugieren que la vía SOS es específica para la homeostasis iónica bajo el estrés salino.

#### Vía de las CDPKs

La subfamilia CDPKs son proteínas monoméricas con una masa molecular de 40 a 90kDa. Las CDPKs constan de cinco dominios: un dominio N-terminal variable, el dominio quinasa, el dominio autoinhibitorio, el dominio autorregulatorio (semejante a la calmodulina) y un dominio C-terminal de longitud variable (Harmon, 2003).

Entre las 5 isoformas de CDPKs, los extremos N y C terminal son variables. Ninguna isoforma es una proteína integral de membrana, aunque un significativo porcentaje de las mismas, tienen sitios potenciales de miristoilación en el inicio de su dominio N terminal altamente variable, lo que se aso-

cia con la unión a la membrana de las CDPKs. Además se ha localizado la secuencia PEST en el extremo amino terminal de algunas CDPKs (la secuencia PEST es una región rica en prolina, glutamina, serina y treonina, la cual se encuentra en proteínas que sufrirán degradación proteolítica). El dominio quinasa conservado es típico de las serin-treonin quinasa y el lazo de activación (entre los subdominios VII y VIII) contiene residuos ácidos por lo que no es necesario fosforilar el lazo para activar la quinasa. Adyacente al dominio catalítico está el dominio autoinhibitorio que contiene una secuencia pseudosustrato que puede interactuar con el sitio activo e inhibir su actividad. El dominio regulatorio semejante a la calmodulina, que contiene 4 dominios *EF-hand* y es capaz de unir cuatro moles de  $\text{Ca}^{2+}$  por mol de enzima. El dominio C-terminal relativamente corto sigue al dominio regulatorio (Klimecka y Munszynska, 2007).

Las CDPKs pertenecen a una familia multigénica, por ejemplo, en *Arabidopsis thaliana* existen 34 genes para las CDPKs. En otras plantas también se ha detectado esta familia multigénica por ejemplo soya (*Glycine max*), tomate (*Lycopersicon esculentum*), arroz (*Oryza sativa*) y maíz (*Zea mays*). Las isoformas de CDPKs de soya ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) difieren en sus patrones de expresión del ARN y en sus propiedades cinéticas y bioquímicas, incluyendo su capacidad para unir el calcio. Esto sostiene la hipótesis de que las CDPKs, a pesar de ser miembro de una sola familia, juegan diferentes papeles mediando las respuestas a varias señales de  $\text{Ca}^{2+}$  (Klimecka y Munszynska, 2007).

Como se ha dicho anteriormente, en respuesta a la sequía y la salinidad, las plantas exhiben elevaciones del nivel de calcio citoplasmático descifrado por las CDPKs (Knigh y Knight, 2001). La elevación en los niveles transcripcionales, así como un incremento de la actividad de las CDPKs, se observó como

respuesta a diferentes estreses. En raíces y tallos de plántulas de arroz de 10 días, después del tratamiento con salinidad se incrementó el nivel de transcritos de OsCDPK. La sobreexpresión de OsCDPK en líneas transgénicas de arroz, permitió obtener plantas más tolerantes a la sequía y la salinidad, por tanto la OsCDPK parece jugar un papel importante en la tolerancia del arroz a diferentes tipos de estreses (Saijo *et al.*, 2000).

En hojas de tabaco el gen NtCDPK1, se regula transcripcionalmente por el NaCl y otros tipos de estrés. Los niveles de ARNm se incrementan después de 1-2 horas de tratamiento (Yoon *et al.*, 1999). Los transcritos de otra CDPK de tabaco, NtCDPK4, se indujeron por el tratamiento con NaCl. Los niveles máximos de transcritos después de 30 minutos de tratamiento con NaCl y retorno a los niveles basales en 2 horas (Zhang *et al.*, 2005). El análisis Northern Blot del ARN, aislado de plantas de *Arabidopsis*, indicó que el ARNm correspondiente al AtCDPK1 y AtCDPK2 se indujeron rápidamente inducidos por la sequía y por la salinidad, no así por las bajas o altas temperaturas. Estos hechos sugieren que un cambio en el potencial osmótico del ambiente dispara la inducción de AtCDPK y AtCDPK4 (Urao *et al.*, 1994). Un incremento en la actividad de una CDPK de 51 kDa se observó en plantas de arroz sometidas a estrés por salinidad, frío y sequía (Li y Komatsu, 2000).

Se han mostrado las funciones de las CDPKs en la transducción de la señal del ABA, pero se carece de evidencias genéticas moleculares que relacionen determinados genes que codifican para las CDPKs con las funciones biológicas a nivel de la planta completa. Zhu y colaboradores (2007) informaron que el ABA estimuló dos CDPKs homólogas en *Arabidopsis thaliana*, CPK4 y CPK11. Las mutaciones en estos genes condujeron a fenotipos insensibles al ABA en cuanto a la germinación de la semilla, el crecimiento de la

plántula, el movimiento estomático y disminución de la tolerancia al estrés salino. Las quinasas CPK4 y CPK11 fosforilan *in vitro* dos factores de transcripción activados por el ABA, ABF1 y ABF4, lo que sugiere que estas quinasas pudieran regular la señalización del ABA a través de estos FT.

#### Vía de las MAPKs

En plantas, las cascadas MAPK participan en la transducción de las señales de auxinas y citoquininas, se implican en la respuesta a las heridas y a los patógenos, así como en la transducción de señales de estrés ambiental (Xiong y Zhu, 2001). La vía MAPK se activa por receptores/sensores tales como proteínas tirosina quinasas, receptores acoplados a proteínas G y dos componentes tirosina quinasas, en respuesta al estrés osmótico y es responsable de la producción de osmolitos importantes en el ajuste osmótico y/o la respuesta a la detoxificación (Rodríguez *et al.*, 2005). Estas cascadas están altamente conservadas en eucariotas y constan de tres proteínas quinasas (Beckers *et al.*, 2009). El núcleo de las cascadas MAPK consiste en tres quinasas que se activan secuencialmente por una quinasa *upstream*. La MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK), después de su activación, fosforila la MAP quinasa quinasa (MAPKK) en residuos de treonina y serina (Ning *et al.*, 2008). Esta MAPKK, doblemente específica, fosforila en cambio a la MAP quinasa (MAPK) en residuos conservados de treonina y serina. La MAPK activada puede, tanto migrar al núcleo para activar los factores de transcripción directamente, o activar otros componentes de la señal para regular la expresión de genes, proteínas asociadas al citoesqueleto y actividades enzimáticas determinadas, o marcar ciertas proteínas marcadas para su degradación (Rodríguez *et al.*, 2005).

El genoma de *Arabidopsis* codifica aproximadamente 60 MAPKKKs, 10 MAPKKs y 20 MAPKs (Chisunnamy, 2004). Los miembros de la cascada MAPK se activan por más de un tipo de estrés, lo que sugiere que las cascadas MAPK actúan como punto de convergencia en la señalización del estrés abiótico. Se descubrió la cascada MAPK de *Arabidopsis* que consta de AtMEKK1, AtMEK1/AtMKK2 y AtMPK4. El estrés salino indujo la expresión y actividad de AtMEKK1 la cual activa la AtMPK4 *in vitro*. La AtMPK4 se activa por el frío, la sequía y el estrés osmótico. Aunque las entradas y salidas de la vía AtMPK4 AtMPK4 no se han definido, un análisis de microarreglo de *mpk1* indicó que los niveles de transcritos de un antiporter Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (AT4623700) se regula negativamente por la AtMPK1 (Chisunnamy, 2004).

En alfalfa una MAPK se activa después de diez minutos de tratamiento con frío, con sequía y estrés mecánico, pero no cuando son sometidas a calor, estrés salino o ABA exógeno (Jonak *et al.*, 1996), lo que sugiere que esta MAPK media la señalización del estrés por frío y por sequía, mediante una vía independiente de ABA.

Otros componentes de la cascada MAPK se han identificado en arroz, maíz, tabaco y tomate, en base a la conservación de su secuencia, aunque se plantea que sus funciones fisiológicas específicas en plantas son en su mayoría desconocidas (Ning *et al.*, 2008).

La NPK1 (*nicotiana protein kinase*) se encuentra de forma natural en tabaco y se activa en la presencia de peróxidos. Bajo condiciones de estrés abiótico, esta proteína quinasa inicia una cascada metabólica de MAPKs, que puede inducir la expresión de HSP (*heat shock protein*) (Assem *et al.*, 2009).

Tres MAPKs, (ANP1, ANP2, ANP3) en *Arabidopsis* comparten una gran similitud con el NPK1 de tabaco, el cual fue la primera MAPKKK aislada en plantas (Kovtun *et al.*,

2000). Se ha informado el papel de algunos miembros de la familia de genes de NPK1, en respuesta a estímulos ambientales en plantas. EL ANP1, que inicia una cascada de fosforilación de dos MAPKs del estrés, AtMPK3 y AtMPK6, participa en las vías de señalización del estrés oxidativo.

Krysan y colaboradores (2002) observaron que la activación de numerosos genes relacionados con el estrés en doble mutantes *anp2anp3*, lo que sugiere que el ANP en plantas silvestres funciona normalmente para regular la respuesta al estrés. Por otro lado, plantas transgénicas de tabaco que sobreexpresan el NPK1 muestran incrementos en su tolerancia a la salinidad.

Ning y colaboradores (2008) informaron la evolución, estructura y perfiles de expresión de 21 genes similares a NPK1 en el genoma de arroz. Especialmente interesante resultó que todos los genes en cluster se inducen por la sequía y la salinidad.

Las cascadas MAPK son importantes en la señalización de los ROS. Numerosos estudios muestran que las vías MAPK de señalización, no son solamente inducidos por los ROS sino también que regulan la producción de ROS. Particularmente MPK3 y MPK6 muestran efectos pleiotrópicos en varios procesos controlados por los ROS, particularmente la apertura estomática (Pitzschke y Hirt, 2009).

### Señalización mediada por fosfolípidos

La membrana plasmática percibe y transmite señales ambientales. El estrés osmótico conduce frecuentemente a alteraciones en la fluidez de la membrana y se sabe que los cambios en los fosfolípidos son eventos importantes que median las señales del estrés osmótico en plantas. La hipótesis más común es que los fosfolípidos son escindidos por fosfolipasas, las cuales producen

segundos mensajeros derivados de fosfolípidos (Munnik y Testerink, 2009). Los fosfolípidos de membrana constituyen un sistema dinámico que genera una multitud de moléculas señalizadoras tales como: inositol 1,4,5-trifosfato (IP3), diacilglicerol (DAG), ácido fosfatídico (PA). En plantas, así como en otros organismos, se distinguen cuatro tipos de fosfolipasas en dependencia de su sitio de ruptura: fosfolipasa D (PLD), fosfolipasa C (PLC) y fosfolipasa A1 y A2 (PLA1 y PLA2). La señalización mediada por fosfolípidos puede ser regulada a través de proteínas G y puede estar relacionada con el calcio (Mahajan y Tuteja, 2005).

La fosfolipasa C (PLC) cataliza la hidrólisis del fosfatidil inositol 4,5-bifosfato (PIP3) en IP3 y DAG, los cuales actúan como segundos mensajeros. EL IP3 libera el calcio de los depósitos internos, a través de canales de calcio de unión a ligando, mientras que el DAG permanece en la membrana donde recluta y activa miembros de la familia de proteína quinasa C (Munnik y Testerink, 2009).

Numerosos estudios muestran en varias especies de plantas que los niveles de IP3 se incrementan rápidamente en respuesta al estrés osmótico (Dewald *et al.*, 2001). Los niveles de IP3 también se incrementaron después del tratamiento con ABA administrado de forma exógena en protoplastos de *Vicia faba* (Lee *et al.*, 1996) y en plántulas de *Arabidopsis* (Xiong *et al.*, 2001). Un gen de *Arabidopsis* que codifica para una PLC, *AtPLC*, se induce también por el estrés salino y la sequía. En células acompañantes, el IP3 indujo el incremento de calcio citoplasmático que condujo al cierre estomático y así a la retención del agua en la célula (Sanders *et al.*, 1999).

La fosfolipasa D cataliza la hidrólisis de fosfolípidos estructurales tales como la fosfatidilcolina. En el genoma de *Arabidopsis* existen 12 genes que codifican fosfolipasas D, mientras que en animales se encuentran

solo 2 y 1 en levadura. La familia fosfolipasa D en plantas se divide en 6 clases en dependencia de la homología en su secuencia y sus propiedades bioquímicas (Wang, 2005). Se ha sugerido que la fosfolipasa D participa en numerosos procesos tales como: transporte vesicular, degradación de membranas y señalización intracelular. Se ha informado que la fosfolipasa D participa en eventos de señalización que ocurren en respuesta a una multitud de estímulos: la congelación, las heridas, la interacción planta-patógeno, la deshidratación y el estrés salino (Bargmann y Munnik, 2006). Se cree que al ácido fosfatídico generado por la acción de la fosfolipasa D actúa como segundo mensajero en la señalización de estos eventos; donde se genera de forma rápida y transiente durante la respuesta al estrés y participa en las cascadas de señalización reclutando las proteínas hacia las membranas celulares y/o influenciando su actividad (Wang, 2005).

Se ha relacionado las foslipasa D con la salinidad y el estrés hiperosmótico en numerosos estudios. En suspensiones celulares de tomate tratadas con NaCl se incrementó la expresión del gen *LePLD  $\alpha$  1* (Laxalt *et al.*, 2001). También se indujo la expresión del gen *AtPLD  $\delta$* , mediante el tratamiento salino y por deshidratación en plantas de *Arabidopsis* (Mane *et al.*, 2007). La expresión "antisense" de *AtPLD  $\alpha$  1* en *Arabidopsis* condujo a un incremento en su sensibilidad al estrés por sequía (Mane *et al.*, 2007). Adicionalmente mutantes *knock-out pld\_3* son hipersensibles al estrés salino, así como al estrés hiperosmótico, mientras que las plantas que sobreexpresan este gen resultaron más resistentes a estos tipos de estreses (Hong *et al.*, 2008).

Bargmann y colaboradores (2009) examinaron la función del gen *PLD $\alpha$*  y  *$\delta$*  en la respuesta de suspensiones celulares de tomate y plantas a la salinidad así como el déficit hídrico. También emplearon simple y dobles mutantes de *Arabidopsis pld $\alpha$ 1* y *P.D.* De-

mostraron que ambas clases de fosfolipasa D se activan por diferentes tipos de estreses y que la carencia de estos genes en *Arabidopsis* disminuye la tolerancia a los medios salinos e hiperosmótico. De forma significativa los dobles mutantes son más sensibles que los mutantes simples.

La fosfolipasa A cataliza la hidrólisis de los fosfolípidos en lisofosfolípidos y ácidos grasos libres, tanto en la posición 1 del esqueleto del glicerol (PLA1) o en la posición 2 (PLA2) (Munnik y Testerink, 2009). Las plantas contienen numerosas PLA. En *Arabidopsis* se distinguen tres familias de fosfolipasas diferentes, aunque en su mayoría no está claro cuales son sus sustratos y cual posición hidrolizan; algunas exhiben actividades aciltransferasa o acilhidrolasa. Como tal, no está claro si sus efectos se reflejan en el metabolismo lipídico en general o en la señalización. No obstante se incrementan las evidencias de que las PLA están involucradas en la resistencia a enfermedades, las auxinas y la luz (Yang *et al.*, 2007). Por otro lado, se plantea que los lisofosfolípidos participan en la señalización celular. En particular la lisofosfatidilcolina, que se ha sugerido como activador de un antiporte vacuolar  $H^+/Na^+$ , que regula el pH citosólico en respuesta a elicitores patógenos (Viehweger, *et al.*, 2006).

### Regulación de la expresión de genes por factores de transcripción

Los diferentes genes de respuesta al estrés pueden ser categorizados en genes de inducción temprana y genes de inducción tardía. Los primeros son inducidos dentro de minutos de la percepción de la señal del estrés y con frecuencia se expresan de forma transiente. Varios factores de transcripción se incluyen entre este tipo de genes, pues su inducción no requiere la síntesis de nuevas proteínas. En contraste, la mayoría de los

genes activados por el estrés se activan lentamente y su expresión es frecuentemente sostenida (Mahajan y Tuteja, 2005).

Los FT se consideran esenciales para los patrones de expresión espacial y temporal de numerosos genes. Estas proteínas se caracterizan por su capacidad para unirse a secuencias reguladoras particulares en los genes que controlan para activar o desactivar su expresión. Poseen un motivo estructural característico, el dominio de unión al ADN, el que participa en el reconocimiento a una pequeña secuencia de ADN (usualmente entre 4-8 pb). En base a la estructura del dominio de unión al ADN, los FT en plantas, se clasifican entre 50 y 60 familias, y constituyen entre un 5 y un 7% de los genes que codifican proteínas (Gray, *et al.*, 2009). En el genoma de *Arabidopsis*, por ejemplo, alrededor del 5,9% codifica para más de 1500 FT. En este epígrafe se hace referencia a algunos FT que regulan la respuesta de la planta frente al estrés a la sequía la salinidad.

Se han identificado los principales regulones que se activan en respuesta al estrés abiótico en *Arabidopsis*. Por ejemplo, los DREB (*dehydration responsive element binding protein*) y CBF (*C-repeat binding factor*), funcionan en la expresión de los genes independientes de ABA. Mientras que los ABRE (*ABA-responsive element*) y ABF (*ABA binding factor*), funcionan de forma dependiente del ABA. Además de estas vías principales, otros regulones tales como el NAC y el MYB/MYC, participan en la expresión de los genes de respuesta al estrés abiótico. Numerosos estudios indican que los regulones DREB1/CBF, DREB2, AREB/ABF, y NAC tienen importantes funciones en la respuesta de la planta frente al estrés abiótico (Nakashima *et al.*, 2009).

El conocimiento de la regulación de los genes, es particularmente importante en el caso de rasgos multigénicos tales como la toleran-

cia a la sequía debido a que vías reguladoras diferentes determinan la expresión de un conjunto completo de genes. En genes regulados por el ABA y el estrés osmótico, uno o más ABREs (*ABA response elements*), juegan un importante papel en la actividad del promotor. Los ABREs tienen un núcleo ACGT. Las proteínas que se unen a estos ABREs contienen una región básica con motivos *zipper* de leucina. Los promotores ABREs y DRE (*dehydration response element*) juegan un importante papel en la regulación de la expresión de los genes en respuesta al estrés por sequía. El DRE también participa en la expresión de genes que responden a la salinidad y las bajas temperaturas.

Los factores de transcripción inducibles por el estrés incluyen miembros de la familia DREB (DRE binding protein), la familia ERF (*ethylene-responsive element binding factor*), la familia de "dedos de zinc", la familia bHLH (*basic helix-loop-helix*), la familia bZIP (*basic domain leucin zipper*) y la familia de los factores de transcripción "*homeodomain*". Estos factores de transcripción pudieran regular varios genes inducibles por el estrés, cooperativamente o de forma separada. El factor de transcripción DREB1A interactúa específicamente con el promotor DRE e induce la expresión de genes de tolerancia al estrés. La sobreexpresión del ADN complementario que codifica para DREB1A en plantas transgénicas de *Arabidopsis*, activaron la expresión de genes de tolerancia al estrés bajo condiciones normales de crecimiento y resultó en una mejoría de la tolerancia a la sequía y la salinidad. El análisis funcional de estos factores de transcripción inducibles por el estrés proporciona más información acerca de la compleja red reguladora de genes involucrados en la respuesta a la sequía y la salinidad. El ABRE es el principal elemento que actúa en cis en la expresión de genes en respuesta al ABA. FT similares, DREB2A y DREB2B se activan por

el estrés osmótico y pueden inducir la expresión de genes en respuesta a este tipo de estrés. Las proteínas de unión a estos complejos de respuesta al ABA contienen dominios bZIP, por ejemplo, la EmBP1 de trigo, TAF1 de tabaco, OSBZ8 y OSZD1 de arroz. Algunos de estos TF son inducidos ellos mismos a niveles transcripcionales por el ABA o tratamiento de estrés.

Zhen y colaboradores (2009) caracterizaron funcionalmente el gen NAC, que codifica el factor de transcripción ONAC045, considerando su papel en la tolerancia al estrés abiótico. Los análisis de expresión revelaron que el ANAC045 se induce por la sequía y la salinidad y el tratamiento con ABA en hojas y raíces de plantas de arroz. Ensayos de activación transcripcional en levadura indicaron que el ONAC045 funciona como activador transcripcional. Plantas transgénicas de arroz que sobreexpresan el ONAC045 mostraron mayor tolerancia a la sequía y la salinidad. Estos resultados sugieren que este FT responde al estrés y pudiera ser un blanco de la ingeniería genética para obtener plantas tolerantes a la salinidad.

Se han informado algunos factores de transcripción tales como CBF1/DREB1B (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998), OsbZIP72 (Lu *et al.*, 2008) y AtMYB44 (Jung *et al.*, 2008), que están involucrados en la respuesta de la planta al estrés abiótico. Las plantas transgénicas que sobreexpresan estos genes pudieran incrementar su tolerancia a varios tipos de estrés abiótico (Zhang *et al.*, 2008).

El FT OsbZIP23 es un miembro de la familia de factores de transcripción bZIP y su expresión se induce fuertemente por condiciones abióticas estresantes tales como la salinidad y la sequía, así como por el ABA. Xiang y colaboradores (2009) obtuvieron que más de 30 genes son posibles blanco de este FT, por lo que plantean que es un FT de amplio espectro. Proponen, además que el OsbZIP23 es el

principal FT de esta familia en arroz y confiere tolerancia a la salinidad y la sequía.

Hasta la fecha se ha descrito varios genes *myb* que se activan en la planta como respuesta a la sequía. Por ejemplo en *Arabidopsis* se induce el FT *AtMYB2* por la deshidratación, y actúa como activador transcripcional de los genes que se inducen en la presencia del ABA durante la sequía. Además, el FT *BcMYB1* aislado de *Boea crassifolia* se induce fuertemente también por la sequía (Du *et al.*, 2009).

### Consideraciones finales

El conocimiento de las vías de transducción de señales en plantas es bastante limitado, en comparación con el existente sobre las vías de transducción de señales en animales y microorganismos.

Las plantas deben ser capaces de soportar un medio ambiente adverso, sin poder cambiar su hábitat como es el caso de los animales, es por ello que deben desarrollar mecanismos que le permitan percibir las variaciones en el medio, trasladar esa información al interior de sus células y elaborar una respuesta que le permita adaptarse. En este sentido, es necesario dirigir algunas investigaciones a la determinación de las estructuras que le permiten a las plantas detectar los cambios en el medio ambiente.

Numerosos estudios genéticos y moleculares han revelado que las vías de transducción de señales en plantas frente a la sequía y la salinidad, involucran numerosos componentes. La multiplicidad de información contenida en el estrés por sequía y por salinidad (entiéndase estrés osmótico, estrés oxidativo, toxicidad iónica) fundamenta la complejidad de la señalización de este fenómeno, pues la respuesta al mismo no es una vía lineal, sino un complejo circuito integra-

do que involucra múltiples rutas y compartimientos celulares específicos, tejidos y la interacción de moléculas señalizadoras para coordinar una respuesta específica a un estímulo dado. Por ejemplo, se ha descrito la vía SOS que involucra una proteína de unión al calcio, que activa una quinasa, que a su vez es capaz de fosforilar determinadas proteínas involucradas en la respuesta al estrés por salinidad y sequía, específicamente para restablecer la homeostasis iónica. Hasta la fecha se han descrito algunas, pero pueden existir otras cuya existencia y posible función se desconocen y sería importante continuar las investigaciones en este sentido.

Asimismo, sería útil profundizar en el conocimiento acerca de los diferentes componentes de la cascada MAPK y sus funciones específicas en la tolerancia de las plantas a la salinidad y la sequía.

Además la tolerancia a la sequía y la salinidad son rasgos multigénicos, por lo que su regulación genética resulta en extremo compleja. Se han caracterizado un gran número de factores de transcripción, pero el conocimiento de su interacción con otras moléculas dentro de la vía de señalización es, en su mayoría, escaso. Por tanto, se debe continuar profundizando el conocimiento acerca de los factores de transcripción que regulan la expresión de los genes de respuesta al estrés, así como su interacción con promotores, con enzimas (ARN polimerasa y otras) y con otros factores de transcripción.

Otras líneas de investigación en este campo involucran el estudio de la interconexión de estas vías de señalización, así como su relación con las vías de respuesta a otros tipos de estrés abiótico y biótico. También sería interesante conocer cómo están dispuestos en la membrana celular los componentes de las vías de transducción de señales que se asocian a esta estructura, ¿se agregan cuando se percibe la señal del estrés, o forman

empaquetamientos en la membrana que le permiten una interacción más eficiente? Sin dudas son muchas las interrogantes y los retos, que con los nuevos adelantos de la proteómica funcional y la metabolómica, se irán solucionando en el futuro.

## Bibliografía

- Bargmann BOR, Laxalt AM, Riet B, Schooten B, Merquiol E, Testerink C, Haring MA, Bartels D y Munnik T, 2009. Multiple PLDs required for high salinity and water deficit tolerance in plants. *Plant Cell Physiol.* 50(1): 78-89.
- Bartels D, Sunkar R, 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 24: 23-58.
- Beckers G, Jaskiewicz M, Liu Y, Underwood WR, He SY, Zhang S, Conrath U, 2009. Mitogen-Activated Protein Kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell.* 21: 944-953.
- Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu J, 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.* 45, 437-448.
- Chinnusamy V, Schumaker K, Zhu JK, 2004. Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *J. Exp. Bot.*, 55: 225-236.
- De Wald DB, Torabinejad J, Jones CA, Shope JC, Cangelosi AR, 2001. Rapid accumulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and inositol 1,4,5-trisphosphate correlates with calcium mobilization in salt-stressed *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 126: 759-769.
- Du H, Zhang L, Liu L, Tang X, Yang W, Wu Y, Huang Y, Tang Y, 2009. Biochemical and molecular characterization of plant MYB transcription factor family. *Biochemistry.* 74 (1): 5-16.
- Gray J, Bevan M, Brutnell T, 2009. A recommendation for naming transcription factor proteins in the grasses. *Plant Physiology.* 149: 4-6.

- Hussain TM, Chandrasekhar T, Hazara M, Sultan Z, Saleb BK, Gopal GR, 2008. Biotech. Mol. Biol. Rev. 3 (1): 8-13.
- Jaglo-Ottosen KR, Gilmour SJ, Zarka DG, Schabenberger O, Thomashow MF, 1998. Arabidopsis CBF1 overexpression induces COR genes and enhances freezing tolerance. Science 280: 104-106.
- Jung C, Seo JS, Han SW, Koo YJ, Kim CH, Song SI, Nahm BH, Choi YD, Cheong JJ, 2008. Overexpression of AtMYB44 enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic Arabidopsis. Plant Physiol. 146: 623-635.
- Klimecka M, Muszynska G, 2007. Structure and functions of plant calcium-dependent protein kinases. Acta Biochimica. 54(2):219-233.
- Kovtun Y, Chiu WL, Tena G, Sheen J, 2000. Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. Proc Natl Acad Sci USA 97:2940-2945.
- Krysan PJ, Jester PJ, Gottwald JR, Sussman MR, 2002. An Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. Plant Cell. 14:1109-1120.
- Lee Y, Choi YB, Suh J, Lee J, Assmann SM, 1996. Abscisic acid induced phosphoinositide turnover in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. Plant Physiol. 110: 987-996.
- Lorenzo L, Merchan F, Laporte P, Thompson R, Clarke J, Sousa C, Crespi M, 2009. A novel plant leucine-rich repeat receptor kinase regulates the response of *Medicago truncatula* roots to salt stress. The Plant Cell. 21:668-680.
- Lu G, Gao C, Zheng X, Han B, 2008. Identification of OsbZIP72 as a positive regulator of ABA response and drought tolerance in rice. Planta [Epub ahead of print].
- Maathuis FJM, Amtmann A, 1999. K<sup>+</sup> nutrition and Na<sup>+</sup> toxicity: the basis of cellular K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> ratios. Annals of Botany. 84: 123-133.
- Mahajan S, Tuteja N, 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. Archives of Biochemistry and Biophysics. 444 139-158.
- Marschner H, 1995. Mineral Nutrition of Higher Plants. Second Edition. Academic Press Ltd., London.
- Munnik T, Testerink C, 2009. Plant phospholipid signaling: "in a nutshell". Journal of Lipid Research. 50:S260-S265.
- Munns R, Tester M, Mechanisms of Salinity Tolerance. 2008. Annual Review of Plant Biology. 59: 651-681.
- Murata Y, Katsura S, Obi I, Kakutani T, 2000. Alterations in Ca<sup>2+</sup>-binding on plasma membrane after adaptation to salt stress of tobacco cells in suspension. Plant and Cell Physiology. 41: 1286-1292.
- Nakashima K, Ito Y, Yamaguchi-Shinozaki K, 2009. Transcriptional Regulatory Networks in Response to Abiotic Stresses in Arabidopsis and Grasses. Plant Physiology. 149: 88-95.
- Ning J, Liu S, Hu H, Xiong L, 2008. Systematic analysis of *NPK1*-like genes in rice reveals a stress-inducible gene cluster co-localized with a quantitative trait locus of drought resistance. Mol Genet Genomics. DOI 10.1007/s00438-008-0385-7.
- Pitzschke A, Hirt H, 2009. Disentangling the Complexity of Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species Signaling. Plant Physiology. 149: 606-615.
- Sanders D, Brownlee C, Harper JF, 1999. Communicating with calcium. Plant Cell. 11: 691-706.
- Shireen K, Assem Ebtissam HA, Hussein Hashem A, Hussein Basry M, 2009. Genetic transformation of the *Nicotiana* Protein Kinase (NPK1) gene confers osmotic tolerance in Egyptian maize. Australian Journal of Basic and Applied Sciences. 3(2): 828-835.
- Viehweger K, Schwartze W, Schumann B, Lein W, Roos W, 2006. The Galpha protein controls a pH-dependent signal path to the induction of phytoalexin biosynthesis in *Eschscholzia californica*. Plant. Cell. 18: 1510-1523.
- Vijayan K, 2009. Approaches for enhancing salt tolerance in mulberry (*Morus* L). A review. Plant Omics Journal. 2(1):41-59.

- Xiang Y, Tang N, Du H, Ye H, Xiong L, 2008. Characterization of OsbZIP23 as a key player of bZIP transcription factor family for conferring ABA sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. *Plant Physiology Preview*. DOI: 10.1104/pp.108.128199.
- Xiong L, Zhu JK, 2001. Abiotic stress signal transduction in plants: molecular and genetic perspectives. *Physiol. Plant.* 112: 152-166.
- Xiong L, Ishitani M, Lee H, Zhu JK, 2001. The *Arabidopsis* *LOS5/ABA3* locus encodes a molybdenum cofactor sulfurase and modulates cold stress- and osmotic stress-responsive gene expression. *Plant Cell* 13: 2063-2083.
- Yang W, Devaiah SP, Pan X, Isaac G, Welti R, Wang X, 2007. AtPLAI is an acyl hydrolase involved in basal jasmonic acid production and *Arabidopsis* resistance to *Botrytis cinerea*. *J. Biol. Chem.* 282: 18116-18128.
- Zhang Y, Li Y, Gao T, Zhu H, 2008. *Arabidopsis* SDI1R1 enhances drought tolerance in crop plants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72(8): 2251-2254.
- Zheng X, Che B, Lu G, Han B, 2009. Overexpression of a NAC transcription factor enhances rice drought and salt tolerance. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379: 985-989.
- Zhou S, Wei S, Boone B, Levy S, 2007. Microarray analysis of genes affected by salt stress in tomato. *African Journal of Environmental Science and Technology*. Vol. 1 (2): 014-026.
- Zhu SY, Yu XC, Wang XJ, Zhao R, Li Y, Fan RC, Shang Y, Du SY, 2007. Two Calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate Abscisic Acid signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. 19:3019-3036.

(Aceptado para publicación el 3 de junio de 2010)