

**REVISIÓN****LAS PROTEÍNAS EN LA TOLERANCIA AL ESTRÉS HÍDRICO EN PLANTAS****PROTEINS IN WATER STRESS TOLERANCE IN PLANTS**Pereyra Cardozo M. <sup>1\*</sup> & A. Quiriban <sup>1</sup>

Recibido 08/10/2013

Aceptado 30/04/2014

**CONTENIDO**

- I. Respuestas de las plantas al estrés por déficit hídrico: Fisiología, biología celular y bioquímica del estrés hídrico.
- II. Enzimas involucradas en las vías de síntesis de osmolitos.
- III. Proteínas con función protectora. Proteínas que protegen a proteínas.
  - Hidrofilinas
  - Proteínas tardías de la embriogénesis (Late Embryogenesis Abundant) (LEA)
  - Heat-shock proteins
  - Dehidrasas
  - Acuaporinas
- IV. Enzimas antioxidantes
  - Superóxido dismutasa
  - Catalasas
  - Ascorbato peroxidasa
  - Guaiacol peroxidasa
  - Glutati6n reductasa
  - Monodehidroascorbato reductasa
  - Dehidroascorbato reductasa
  - Glutati6n s-transferasas
  - Glutati6n peroxidasa
- V. Péptidos antioxidantes
  - Glutati6n
- VI. Factores de transcripci6n
- VII. Aminoácidos
- VIII. Conclusiones

**RESUMEN**

A lo largo de la evoluci6n, las plantas han desarrollado diferentes respuestas y adaptaciones que les permiten sobrevivir en condiciones de déficit hídrico. Estas estrategias de adaptaci6n pueden ocurrir a nivel fisiol6gico, celular y molecular. En este último nivel, al modificarse la expresi6n génica, se producen diferentes proteínas cuya funci6n puede ser: a) otorgar tolerancia ante una limitaci6n hídrica, actuando como moléculas protectoras, o b) seales regulatorias. El conocimiento de estas proteínas y sus funciones, puede ser utilizado por la Biología Molecular y la Ingenieria Genética, en la generaci6n de plantas tolerantes a las limitaciones hídricas, siendo un importante aporte a la producci6n agrícola

<sup>1</sup> Cátedra de Química Biológica, Facultad de Agronomía UNLPam.

\* pereyra@agro.unlpam.edu.ar

en regiones con baja disponibilidad de agua.

**PALABRAS CLAVE:** plantas, estrés hídrico, proteínas.

## **ABSTRACT**

In the course of evolution, plants have developed different responses and adaptations allowing them to survive under water deficit. These adaptation strategies can occur at physiological, cellular and molecular levels. At the latter one, gene expression modification would produce different proteins whose function may be: a) acting as protective molecules which contribute to water deficit tolerance, or b) acting as carriers of regulatory signals. Knowledge of these proteins and their functions can be used by Molecular Biology and Genetic Engineering to obtain plants tolerant to water limitations, as an important aid to agricultural production in regions with low hydric availability.

**KEY WORDS:** plants, water stress, proteins

## **I. RESPUESTAS DE LAS PLANTAS AL ESTRÉS POR DÉFICIT HÍDRICO: FISIOLOGÍA, BIOLOGÍA CELULAR Y BIOQUÍMICA DEL ESTRÉS HÍDRICO**

A lo largo de la evolución, las plantas han desarrollado diferentes respuestas y adaptaciones que les permiten sobrevivir en condiciones de déficit hídrico. Muchas de estas adaptaciones, están relacionadas con una mayor capacidad de absorber agua o con un uso más eficiente de este recurso.

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. Un mecanismo de resistencia, a nivel fisiológico, es el cierre de estomas, estructuras responsables de la mayor proporción de pérdida de agua en las plantas, respuesta mediada por el ácido abscísico (ABA) (Langridge *et al.*, 2006; Moreno, 2009).

Las plantas también responden al estrés por déficit hídrico a nivel celular y molecular, y una de las principales respuestas a esta limitación es la modificación de la expresión genética.

La expresión de los genes inducidos por estrés puede ser categorizada en tres grupos: 1) genes que codifican proteínas con funciones estructurales o enzimáticas conocidas; 2) proteínas con funciones aún desconocidas y 3) proteínas reguladoras (Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2008).

El análisis del transcriptoma permite analizar la función de los productos de los genes en res-

puesta al estrés hídrico y se pueden clasificar en dos grupos: a) proteínas funcionales, involucradas en tolerancia al estrés y adaptación celular tales como, proteínas canal, enzimas que participan en la síntesis de osmólitos, proteínas tardías de la embriogénesis (LEA) proteínas y enzimas de detoxificación; y b) proteínas reguladoras que regulan la expresión de los genes y traducción de señales en respuesta al estrés, tales como factores de transcripción, quinasas y 14-3-3 proteínas (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997; Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2005).

La respuesta de las plantas a diferentes tipos de estrés generalmente modifica el patrón proteico. Estos cambios están relacionados con modificaciones en la expresión de genes específicos dependiendo de la naturaleza, duración y severidad del estrés (Moreno, 2009). Para adaptarse al ambiente, las plantas activan un gran set de genes, lo cual lleva a la acumulación de proteínas asociadas específicamente al estrés (Hussain *et al.*, 2011).

Diversas proteínas específicas han sido caracterizadas en plantas bajo condiciones de estrés y pueden ser clasificadas como LEA (Late Embryogenesis Abundant) proteínas, dehidrinas (proteínas inducidas por deshidratación), proteínas tolerantes a la desecación, proteínas que responden al ácido abscísico (ABA), proteínas reguladas por el frío, proteasas, enzimas requeridas para la biosíntesis de varios osmoprotectores tales como: azúcares, proteínas, glicinbetaína, enzimas para detoxificación y factores proteicos

involucrados en la regulación de la traducción de señales y expresión génica, tales como quinasas y factores de transcripción (Reddy *et al.*, 2004). La sequía induce genes cuya función no sólo es proteger a las células vegetales de la deshidratación, sino que también actúan en la regulación de otros genes que se traducen en señales de respuesta al estrés hídrico (Reddy *et al.*, 2004).

Ante condiciones de estrés hídrico, ciertas enzimas y proteínas son afectadas y pierden su actividad biológica. Por lo tanto, el mantenimiento de las proteínas en su forma funcional y el prevenir el agregado de proteínas es particularmente importante, para la vida de la célula bajo condiciones de estrés. Esa función es llevada a cabo, entre otras moléculas, por proteínas.

La tolerancia a la sequía puede ser considerada como la tolerancia a una deshidratación moderada, y la tolerancia a la desecación generalmente se refiere a la tolerancia a una mayor deshidratación. Asimismo, la tolerancia a la desecación incluye la posibilidad de las células de rehidratarse exitosamente. Los mecanismos que confieren tolerancia a la sequía están principalmente basados en la estabilización estructural por hidratación preferencial, mientras que los mecanismos que otorgan tolerancia a la desecación están basados en el reemplazo del agua por moléculas que forman puentes hidrógenos (Folkert *et al.*, 2001).

La disminución del volumen celular, aumenta la posibilidad de las interacciones moleculares que pueden causar la desnaturalización de las proteínas y membranas. Dentro de los compuestos químicos que pueden prevenir estas interacciones adversas, podemos citar: prolina, glutamato, glicinbetaína, carnitina, manitol, sorbitol, fructanos, polialcoholes, trehalosa, sacarosa y oligosacáridos. Los mismos son químicamente diferentes y generalmente son excluidos de la superficie de la proteína, posibilitando que la proteína permanezca hidratada. Ante condiciones de menor disponibilidad de agua, existen las proteínas LEA y Heat shock protein (HSP) que actúan "reemplazando el agua", dado que forman puentes hidrógenos con las proteínas (Folkert *et al.*, 2001).

## II. ENZIMAS INVOLUCRADAS EN LAS VÍAS DE SÍNTESIS DE OSMOLITOS

Un mecanismo adaptativo para la protección contra la sequía, es el mantenimiento de la turgencia celular, durante los períodos de sequía, regulando la presión osmótica de las células. Para ello, la célula puede: a) secuestrar iones en los compartimentos celulares y b) sintetizar osmolitos especializados tales como la prolina, glicinbetaína, manitol, trehalosa, ononitol y ectoína para reajustar el potencial osmótico celular (Langridge *et al.*, 2006). Los osmolitos son principalmente compuestos orgánicos de bajo peso molecular que permiten el ajuste osmótico y facilitan la absorción de agua por la planta (Cushman, 2001).

Otra función de los osmolitos es participar en el mantenimiento de la estructura de las proteínas bajo condiciones de estrés. El aminoácido prolina y los azúcares, principalmente la trehalosa (Miller *et al.*, 1998) pueden cubrir las moléculas de proteína excluyendo los solutos de su superficie y en consecuencia reducir el desplegamiento. Durante la desecación extrema, las plantas tolerantes sintetizan grandes cantidades de azúcares disacáridos no reductores, tales como trehalosa, que puede sustituir por agua los requerimientos de puentes hidrógenos, de los residuos de aminoácidos polares en la superficie de la proteína y mantener su estructura nativa.

El aminoácido prolina se acumula en grandes cantidades en las plantas superiores en respuesta a un estrés ambiental. Además de su rol como soluto en el ajuste osmótico, la prolina contribuye a estabilizar estructuras subcelulares, membranas y proteínas, eliminación de radicales libres y como buffer del potencial redox bajo estrés (Ashraf & Foolad, 2007).

El aumento en el contenido de prolina puede deberse a la inhibición en su desaparición o bien al aumento de la actividad de síntesis. Una enzima que regula la síntesis de éste aminoácido es la prolina oxidasa (PROX). Esta enzima cataliza la formación de glutamato a partir de prolina y su actividad se reduce en condiciones de estrés hídrico, afectando el nivel de prolina libre.

La acumulación de prolina en hojas en condiciones de bajo potencial agua, es causada por

una combinación del aumento de la biosíntesis y una menor oxidación en mitocondrias (Raymond & Smirnov, 2002). También se observa un aumento en la síntesis de los transportadores del aminoácido prolina.

Las enzimas pirrolina-5-carboxilato sintetasa (P5CS) y pirrolina-5-carboxilato reductasa (P5CR), participan en los pasos metabólicos de la síntesis de prolina (Ashraf & Foolad, 2007). La P5CS es la enzima que cataliza la etapa limitante en la biosíntesis de prolina en plantas y está sujeta a una inhibición por retroalimentación por la prolina. Ha sido sugerido que esta regulación de la P5CS deja de actuar en plantas bajo condiciones de estrés (Shao *et al.*, 2008).

La inducción de la acumulación de prolina podría ser debido a la activación de la síntesis de prolina por la vía del glutamato. Las plantas poseen dos vías para la biosíntesis de prolina: la del glutamato y la de la ornitina, siendo, en condiciones de estrés, la primera vía la más activa.

En la vía del glutamato, este aminoácido es convertido por la P5CS en  $\gamma$ -glutamil semialdehído. Otra enzima que regula la síntesis de prolina es la  $\gamma$ -glutamil quinasa. Este producto se cicla espontáneamente a  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C), el cual es reducido por el NADPH a prolina por la P5CR (Ashraf & Foolad, 2007). La actividad de la  $\gamma$ -glutamil quinasa aumenta bajo condiciones de estrés (Shao *et al.*, 2008).

Las enzimas relacionadas con la síntesis de prolina se encuentran principalmente en citoplasma. Mientras que las involucradas en el catabolismo se encuentran en mitocondrias. La prolina puede ser sintetizada en diferentes compartimentos subcelulares dependiendo de las condiciones ambientales (Szabados & Saviour, 2009).

### III. PROTEÍNAS CON FUNCIÓN PROTECTORA. PROTEÍNAS QUE PROTEGEN A PROTEÍNAS

#### *Hidrofilinas*

Las proteínas LEA integran un amplio grupo de proteínas denominado hidrofilinas (Garay-Arroyo *et al.*, 2000; Reyes *et al.*, 2005; Battaglia *et al.*, 2008). Estas son proteínas no estructuradas o flexibles que participan en la respuesta a condiciones adversas (Cuevas-Velázquez & Co-

varrubias-Robles, 2011). Las mismas presentan glicina en proporciones mayores al 6% y un índice de hidrofiliidad superior a uno. Si bien el rol funcional aún es especulativo, existen evidencias de que estas proteínas participan en la aclimatación y/o en la respuesta adaptativa al estrés hídrico y bajas temperaturas (Reyes *et al.*, 2005).

Reyes *et al.* (2005), mostraron en experimentos *in vitro*, que las hidrofilinas son eficientes protectores de la actividad de las enzimas por un mecanismo que previene la modificación de la estructura de la enzima. Las hidrofilinas pueden estabilizar estructuras celulares y macromoléculas. Sus segmentos altamente hidrofílicos pueden ordenar el agua alrededor de las macromoléculas, previniendo la exposición de los dominios hidrofóbicos de la enzima hacia el solvente.

A su vez, pueden usar sus residuos polares para interactuar con los grupos químicos presentes en la superficie de otras proteínas, reemplazando el agua y evitando los cambios de conformación y consecuentemente la inactivación de las proteínas en condiciones de baja disponibilidad de agua (Reyes *et al.*, 2005).

Trabajos experimentales han demostrado, que la sobreexpresión de una proteína AtLEA4 en *Arabidopsis* (Brassicaceae) conduce a un fenotipo tolerante comparado con el tipo salvaje en la tolerancia al estrés hídrico. Por otra parte, la reducción en los niveles de estas proteínas lleva a plantas más sensibles ante condiciones limitantes de agua respecto de los genotipos silvestres. Las proteínas LEA4 están involucradas en la respuesta adaptativa de las plantas vasculares de resistencia al déficit hídrico (Olvera-Carrillo *et al.*, 2010)

#### *Proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (Late Embryogenesis Abundant) (LEA) proteínas*

Entre las proteínas más importantes por su efecto protector potencial están las proteínas LEA (Late Embryogenesis Abundant) y las que funcionan como antioxidantes (Danon *et al.*, 2005).

Las proteínas LEA protegen a las proteínas y

membranas del daño debido a la deshidratación (Bray, 1993). La progresiva sequía y salinidad induce la síntesis de estas proteínas en los órganos vegetativos, las cuales estabilizan las enzimas y la estructura de las membranas. Las proteínas LEA participan en la reducción del daño celular durante la deshidratación, aunque el mecanismo preciso involucrado aún debe ser explorado.

El análisis bioquímico ha mostrado que las proteínas LEA, pueden prevenir la agregación inducida por la desecación y las bajas temperaturas. Se propone que funcionan como chaperonas, como moléculas protectoras y actúan evitando el daño celular (Thapa *et al.*, 2011). Predicciones de su estructura secundaria sugieren que la mayoría de las proteínas LEA, existen como hélice al azar, poseen estructuras desplegadas en su estructura nativa, y unos pocos miembros existen como dímeros o tetrámeros. Son proteínas estables al calor y no coagulan en ebullición. Otra característica común es que los genes que las codifican están regulados a nivel de la transcripción y responden al ABA (Wang *et al.*, 2003).

Cuevas-Velázquez y Covarrubias-Robles (2011), sugieren que las proteínas LEA presentan diferentes organizaciones estructurales dependiendo de la cantidad de agua disponible y del agrupamiento molecular en la célula, lo que a su vez podría modular el reconocimiento de diferentes ligandos. Estas proteínas son altamente flexibles en solución acuosa, condición poco frecuente en la célula; ante una disminución en la disponibilidad de agua y ante el consecuente incremento en la concentración intracelular de las macromoléculas, las proteínas LEA tenderán a adquirir una conformación más definida que les permitirá reconocer algún o algunos ligandos y de esta forma estabilizarse (Cuevas-Velázquez & Covarrubias-Robles, 2011).

Las proteínas LEA son capaces de prevenir los cambios estructurales que se promueven por los efectos de la limitación de agua en proteínas/enzimas reporteras (como la lactato deshidrogenasa), que pudieran llegar a su desnaturalización y consecuente agregación, y que tiene como consecuencia una desactivación de éstas (Cuevas-Velázquez & Covarrubias-Ro-

bles, 2011).

Ha sido encontrado en experimentos *in vitro*, que al deshidratar de manera progresiva a la enzima reportera, ésta pierde paulatinamente su actividad; sin embargo, si antes de iniciar la deshidratación se le agrega una proteína LEA, en una relación molar 1:1, la actividad de la enzima reportera se mantiene en un mayor nivel que cuando no es protegida por la adición de LEA. El hecho de que estas proteínas sean capaces de proteger a la enzima reportera en una relación molar 1:1, es indicativo de que uno de los posibles mecanismos de protección sea a través de una interacción directa proteína LEA-proteína blanco (Cuevas-Velázquez & Covarrubias-Robles, 2011).

Olvera-Carrillo *et al.* (2010), mostraron el rol de las proteínas LEA en la adaptación de las plantas superiores a la sequía y desecación desde una aproximación genética, correlacionando la presencia y abundancia de miembros de esta familia de proteínas con el ajuste al estrés en la mayoría de los estados de desarrollo de su ciclo de vida. También encontraron que una inducción específica y mayor abundancia es necesario, pero no suficiente, para la adaptación al estrés hídrico, sugiriendo que cada LEA gen, está involucrado en ayudar en el proceso adaptativo en plantas superiores dependiendo del estado de desarrollo, del tejido así como del tipo y severidad del estrés. Esto muestra que no hay redundancia funcional entre los diferentes grupos de proteínas LEA.

Wise & Tunnacliffe (2004), trabajando con un método denominado Protein or Oligonucleotide Probability Profile (POPP), encontraron que la descripción de los tres principales grupos de proteínas LEA como hidrofílicas, es una característica confirmada por la presencia de un considerable número de residuos cargados y/o polares. La lisina está fuertemente representada en los grupos 2 y 3 y su presencia es moderada en el grupo 1. El Grupo 1 también muestra un alto contenido de arginina. Mientras que el glutamato está fuertemente representado en el Grupo 1 y 3 y moderadamente en el Grupo 2. Estas proteínas son deficientes en cisteína, mientras que la fenilalanina, triptofano, isoleucina, y asparagina se encuentran pobremente re-

presentados. La glicina está fuertemente presente en los Grupos 1 y 2, pero es escasa en el Grupo 3.

Cada superfamilia se identifica con una función propia, y cada subfamilia tiene un patrón característico de funcionalidad. El Grupo 3b, está conformado por proteínas nucleares que interactúan con el ADN y con histonas, pero más específicamente con H1 histonas. Aunque el Grupo 2b reconoce al ADN también interactúa con proteínas. Otra información es que las proteínas LEA no tienen estructura, al menos los tres grupos mayoritarios, son proteínas desplegadas en su forma nativa, o intrínsecamente desordenadas. Sin embargo, esta falta de estructura no significa falta de función, porque el plegamiento de estas proteínas puede ocurrir al unirse a una molécula biológica objetivo. Otra posibilidad es que el estrés abiótico puede inducir el plegamiento. De manera que la estructura depende de la disponibilidad de agua (Cuevas-Velázquez & Covarrubias-Robles, 2011; Reyes *et al.*, 2005; Wise & Tunnacliffe, 2004).

### **Dehidrinas**

Las dehidrinas son proteínas inducidas por estrés hídrico, que presentan una secuencia consenso de 15 aminoácidos (EKKGIMDKI-KEKLPG), que está relacionada con las interacciones hidrofóbicas que estabilizan la macromolécula, y posibilitan la interacción sinérgica con los solutos compatibles (Reddy *et al.*, 2004).

Las fibrilinas-34 son proteínas asociadas a los lípidos presentes en los plástidos, y en respuesta al estrés hídrico se produce un aumento de las mismas. Poseen la propiedad de estabilizar los carotenoides y tilacoides durante la deshidratación (Reddy *et al.*, 2004).

Las dehidrinas o grupo 2 LEA son proteínas extremadamente hidrofílicas y debido a su estado desordenado éstas se pueden unir a proteínas de membranas, ARN y ADN. Se postula que estas propiedades permiten a las dehidrinas interactuar con otras macromoléculas celulares y protegerlas de la deshidratación (Waterer *et al.*, 2010).

### **Heat-shock proteins (HSPs)**

Las Heat-shock proteins (HSPs) comprenden

un grupo reducido de moléculas de alto peso molecular y un grupo complejo de proteínas de bajo peso cuyo tamaño varía entre 15 y 30 KDa. Estas proteínas son parte de un grupo de proteínas inducidas para proteger las plantas del daño causado por estrés o para ayudar a reparar el daño causado por el estrés (Sato & Yokoya, 2008). La tolerancia al estrés conferida por las HSPs ha sido parcialmente atribuida a la asociación de las HSPs con las membranas. Es posible que estas proteínas se asocien a las membranas como resultado de cambios inducidos por la sequía en la arquitectura celular y de esta manera ayudan en el sostenimiento de la membrana, no afectándose los procesos que ocurren en ésta (Sato & Yokoya, 2008). Las HSPs son moléculas chaperonas, producidas en respuesta a un aumento de la temperatura u otro estrés. HSPs aisladas mostraron proteger hasta el 75% de las proteínas solubles de la desnaturalización por calor *in vitro*. Muchas proteínas en respuesta al estrés, especialmente HSPs, actúan como chaperonas moleculares y mantienen la homeostasis del plegamiento de la proteína y son responsables de la adquisición de la tolerancia al estrés.

Entre las cinco familias conservadas de HSPs (HSP100, HSP90, HSP70, HSP60) y sHSP, las más pequeñas son las que prevalecen en plantas (Wang *et al.*, 2003). Están codificadas por los genes nucleares y se dividen en seis clases en función de la ubicación celular, clase I: se encuentran en citoplasmas, clase II: en cloroplastos, mitocondrias, retículo endoplásmico y peroxisoma. Estas chaperonas participan en la estabilización de proteínas y membranas y en ayudar a las proteínas a recuperar su forma nativa luego de las condiciones de estrés. En arroz se encontró que las HSP17.7 podrían contribuir a la protección de la estructura de la membrana plasmática (Sato & Yokoya, 2008).

### **Acuaporinas**

Las acuaporinas constituyen una familia de proteínas que regulan el movimiento del agua a través de las membranas celulares (Hussain *et al.*, 2011). Estas moléculas fueron descubiertas por los investigadores estadounidenses Peter Agre y Roderick Mac Kinnon, quienes recibieron el premio Nobel de Química en el año 2003

por sus investigaciones sobre la estructura proteica de los canales iónicos y del agua en la membrana celular. (Castagnino, 2004).

Se han descrito en *Arabidopsis thaliana* 600 proteínas transportadoras, entre ellas 40 fueron clasificadas como acuaporinas (Castagnino, 2004). Otros investigadores, encontraron 33 acuaporinas en el arroz, 37 en tomate, 36 en maíz y 55 en álamo (Hussain *et al.*, 2011).

Las acuaporinas se pueden dividir en dos subgrupos principales, por un lado las proteínas intrínsecas ubicadas en la membrana plasmática y por otro las ubicadas en el tonoplasto. Las primeras participan del transporte de agua a través de la membrana celular, en tanto que las segundas participan en el intercambio de agua entre el citoplasma y la vacuola y en la osmoregulación.

Varios investigadores sugieren que un aumento en la cantidad de acuaporinas otorga a la planta una habilidad adicional para sobrevivir ante condiciones de estrés hídrico. Otros autores sostienen que las plantas evitan una excesiva pérdida de agua regulando las acuaporinas durante la deshidratación (Hussain *et al.*, 2011). Por esos motivos, es importante conocer la dinámica de las acuaporinas y así entender la manera en que la célula vegetal regula a nivel de membrana su permeabilidad al agua (Hachez *et al.*, 2013).

Trabajos experimentales demostraron que la sobreexpresión de diferentes genes de acuaporinas, se traduce en incremento no solo de la tolerancia a la sequía sino también de mayor rendimiento, actividad fotosintética y estabilidad de membranas (Hussain *et al.*, 2011).

La actividad y especificidad de estas proteínas es regulada por fosforilación (Schäffner, 1998). Su regulación y abundancia en la membrana plasmática posibilitan una rápida y precisa adaptación a condiciones adversas (Hachez *et al.*, 2013).

#### IV. ENZIMAS ANTIOXIDANTES

Los procesos metabólicos aeróbicos tales como la respiración y la fotosíntesis inevitablemente llevan a la producción de especies reactivas de oxígeno (EROs) en mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas.

En condiciones fisiológicas, el equilibrio entre la producción y la remoción de EROs puede ser perturbado por factores de estrés abióticos tales como alta luminosidad, sequía, bajas y altas temperaturas y estrés mecánico, dando como resultado el aumento en el nivel intracelular de EROs (Apel & Hirt, 2004).

Así el estrés oxidativo (EO), se refiere a una situación de desequilibrio, que puede ser el resultado de la disminución de los antioxidantes o del aumento en la producción de EROs. Cuando ocurre el EO la actividad celular conduce a la activación o silenciamiento de genes que codifican mecanismos de defensa, factores de transcripción y proteínas estructurales.

El estrés hídrico está acompañado por la formación de EROs, tales como  $O_2^-$ ,  $H_2O_2$  y  $OH^-$  los que producen daños en el ADN, en los lípidos y en las proteínas. Las plantas han desarrollado varias estrategias antioxidantes para eliminar estos compuestos tóxicos. Dentro de éstas podemos citar los mecanismos celulares, para inhibir la acumulación de EROs. Por ejemplo, adaptaciones anatómicas, desarrollo de epidermis refractaria, adaptaciones fisiológicas y moleculares, moléculas antioxidantes, enzimas y otros sistemas más complejos. El aumento de las defensas antioxidantes en plantas, puede aumentar la tolerancia a diferentes factores de estrés.

Los mecanismos de detoxificación de EROs existen en todas las plantas y pueden ser categorizados como enzimáticos: superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), ascorbato peroxidasa (APX), peroxidasa (POD), glutatión reductasa (GR) y monodehidroascorbato reductasa (MDAR) y no enzimáticos, los cuales se clasifican en dos tipos: 1) ácido ascórbico (AA) y 2) pigmentos como los carotenoides flavonoides y antocianinas (Reddy *et al.*, 2004). Wang *et al.*, (2003), sugieren también compuestos adicionales como osmolitos, proteínas, por ejemplo peroxiredoxina, y moléculas como el tocoferol.

En las plantas superiores, las señales de las EROs, pueden sensar, transducir y traducir en respuestas celulares. El proceso requiere la presencia de proteínas sensibles al sistema redox que pueden experimentar una oxidación/reduc-

ción reversible y activarse o desactivarse dependiendo del estado redox de la célula. Las EROs pueden oxidar las proteínas sensibles al sistema redox directamente o indirectamente por la vía de moléculas sensibles al sistema redox, tal como glutatión (GSH) o tioredoxinas, los cuales controlan el estado redox celular en plantas superiores.

Las enzimas sensibles al sistema redox pueden directamente modular el metabolismo celular, donde proteínas sensibles al sistema redox llevan a cabo su función activando quinasas, fosfatasa y factores de transcripción. Corrientemente dos mecanismos moleculares regulan la función de las proteínas sensibles al sistema redox. Las señales mediadas por EROs involucran hetero-trimeric G-proteínas y fosforilación de la proteína regulada por MAP quinasas y Tyr fosfatasa. En plantas, el sistema transductor mejor conocido es el de la ferredoxina-tioredoxina en estromas, el cual regula el metabolismo del carbono fotosintético. (Shao *et al.*, 2008).

Los RNAm correspondientes a los genes de las enzimas antioxidantes son inducidos por estrés hídrico. Algunos de los genes inducibles por estrés hídrico, que codifican para proteínas tales como 1 pirrolina 5 carboxilato sintasa, una enzima clave en la síntesis de prolina, fue sobreexpresada para producir tolerancia al estrés hídrico.

### ***Superóxido dismutasa (SOD)***

La metaloenzima SOD, es la enzima intracelular más efectiva antioxidante, la cual es ubicua en todos los organismos aeróbicos y en todos los compartimentos subcelulares. Está bien establecido que el estrés hídrico frecuentemente lleva a un incremento en la generación de EROs, mientras que SOD ha sido propuesta como un importante factor de tolerancia al estrés, y es la primera línea de defensa contra los efectos tóxicos de elevados niveles de EROs.

Las SODs remueven el  $O_2^-$ , catalizando su transformación en  $H_2O_2$  y  $O_2$ . Las SODs están clasificadas según el cofactor en tres tipos: las que contienen cobre/Zn (Cu/Zn-SOD), manganeso (Mn-SOD), y hierro (Fe-SOD), las cuales están localizadas en diferentes compartimentos

celulares (Gill & Tuteja, 2010).

### ***Catalasas (CAT)***

Las catalasas son enzimas tetraméricas que contiene el grupo hemo, y catalizan la transformación del  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$ . La catalasa tiene uno de los ritmos de recambio más elevados. Una molécula de CAT puede convertir aproximadamente 6 millones de moléculas de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$  por minuto (Gill & Tuteja, 2010).

### ***Ascorbato peroxidasa (APX)***

APX se pensó que juega un rol esencial en la eliminación de EROs y la protección de las células en las plantas superiores. APX está involucrada en la eliminación del  $H_2O_2$ , y el ciclo ASH-GSH y utiliza ASH como dadora de electrones. La familia de APX consiste al menos de cinco isoformas, ubicadas en discos tilacoides, membranas de glioxisomas, estroma de cloroplastos y citoplasma.

APX tiene una alta afinidad por  $H_2O_2$  (del orden  $\mu M$ ), mientras que la CAT y POD (del orden mM) y tiene mayor importancia en el manejo de EROs durante el estrés (Gill & Tuteja, 2010).

### ***Guaiacol peroxidasa (GPOX)***

APX puede distinguirse de GPOX en términos de diferencias en las secuencias y funciones fisiológicas. GPOX descompone el ácido 3-indolacético (IAA) y tiene un rol en la biosíntesis del guaiacol y piragalol oxidando el ascorbato. La actividad del GPOX, varía considerablemente dependiendo de las especies vegetales y las condiciones de estrés (Gill & Tuteja, 2010).

### ***Glutatión reductasa (GR)***

GR es una flavoproteína, oxidoreductasa. Es una enzima potencial del ciclo ASH-GSH y juega un papel esencial en el sistema de defensa contra los EROs. Está localizada predominantemente en cloroplastos, aunque también se encuentra en mitocondria y citoplasma. La GR cataliza la reducción de GSH, una molécula involucrada en varios procesos regulatorios y antioxidativos en plantas donde la GR cataliza una reacción dependiente del NADPH del enlace disulfuro de GSSG (Glutatión oxidado) y es importante para mantener el reservorio de GSH (Glutatión reducido). GSSG consiste de



dos GSH unidos por un puente disulfuro el cual puede ser convertido a GSH por GR. GR está involucrada en la defensa contra el estrés oxidativo, mientras que GSH juega un importante rol, en el sistema celular, lo cual incluye la participación en el ciclo ASH-GSH. GR y GSH juegan un papel crucial en determinar la tolerancia de la planta a diferentes estrés (Gill & Tuteja, 2010).

### ***Monodehidroascorbato reductasa (MDHAR)***

MDHAR es una enzima que contiene Flavín Adenín dinucleótido (FAD) como grupo prostético, y se encuentra en citoplasma y cloroplastos. Esta enzima exhibe una alta especificidad por el monodehydro ascorbato (MDHA) como aceptor de electrones, prefiriendo NADH más que NADPH como dador de electrones (Gill & Tuteja, 2010).

### ***Dehidroascorbato reductasa (DHAR)***

DHAR regenera ASH de su estado oxidado y regula el estado redox celular ASH el cual es crucial para la tolerancia a distintos estrés que llevan a la producción de EROs (Gill & Tuteja, 2010).

### ***Glutación S- transferasas (GST)***

Las glutaciones transferasas de plantas, son un gran grupo de enzimas que catalizan la conjugación de un sustrato xenobiótico electrofílico con un tripéptido glutatione (GSH; glu-cys-gly). Las GSTs pueden reducir el peróxido con la ayuda de GSH. Son proteínas citoplasmáticas, aunque también se han encontrado en plástidos y núcleo. GSTs son muy abundantes y en algunos casos representan más del 1% de las proteínas solubles en células vegetales (Gill & Tuteja, 2010).

### ***Glutación peroxidasa (GPX)***

GPXs es una gran familia de diversas isoenzimas que usan GSH para reducir  $H_2O_2$  e hidroperóxidos orgánicos y lipídicos, protegiendo a la planta del estrés oxidativo. Se encuentran en citoplasma, cloroplasto, mitocondrias y retículo endoplásmico (Gill & Tuteja, 2010).

## **V. PÉPTIDOS ANTIOXIDANTES**

### ***Glutación***

El glutación junto con el ácido ascórbico, la prolina,  $\alpha$  tocoferoles, carotenoides y flavonoi-

des, constituyen los antioxidantes no enzimáticos. El glutación, un tripéptido ( $\alpha$  glutamil-cisteína-glicina), es uno de los metabolitos cruciales en plantas, el cual es considerado como una importante defensa intracelular contra las EROs.

El glutación existe abundantemente en su forma reducida (GSH) en los tejidos vegetales y está localizado en citoplasma, retículo endoplásmico, vacuolas, mitocondrias, cloroplastos y peroxisomas. Es de especial importancia en procesos fisiológicos incluyendo la regulación del transporte del sulfato, traducción de señales conjugación de metabolitos, detoxificación de xenobióticos y la expresión de genes en respuesta al estrés.

Ha sido establecido que GSH también juega un rol importante en eventos relacionados con el crecimiento, tales como: la diferenciación celular, muerte celular, senescencia, resistencia a patógenos y regulación enzimática (Gill & Tuteja, 2010).

El glutación es la principal fuente de tioles no proteicos en la mayoría de las células. La naturaleza nucleofílica del grupo tiol es también importante en la formación de enlaces mercáptidos con metales. Esta reactividad junto con la estabilidad y la alta solubilidad en agua del GSH hace de él un buen protector vegetal bioquímico contra el estrés (Shao *et al.*, 2008).

El glutación tiene parte en el control de los niveles de  $H_2O_2$ . El cambio en la relación de Glutación reducido (GSH), glutación oxidado (GSSG) durante la degradación del  $H_2O_2$  es una importante señal. Ha sido sugerido que la relación GSH/GSSG, indicador del estado redox celular podría estar involucrado en la percepción de las EROs. El glutación reducido actúa como un antioxidante y está involucrado directamente en la reducción de la mayoría de los radicales de oxígeno libres generados debido al estrés (Shao *et al.*, 2008).

## **VI. FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN**

Los factores de transcripción (FTs), son proteínas que regulan la expresión génica.

Estas proteínas son capaces de unirse específicamente a secuencias cortas de ADN (elementos en cis) localizadas en los promotores de los genes, e interactuar con el complejo de pre-iniciación de la transcripción para inducir o inhibir

la actividad de la enzima ARN polimerasa II. De esta manera, los factores de transcripción modulan la tasa de transcripción de sus genes blanco a través de un sistema denominado regulón (Nakashima *et al.*, 2009).

Varios FTs pueden interactuar con los elementos que actúan en cis en las regiones promotoras, formando un complejo de iniciación transcripcional sobre la caja TATA (promotor central) corriente arriba del sitio de iniciación de la transcripción. El complejo de iniciación transcripcional activa la ARN polimerasa para iniciar la transcripción de los genes de respuesta al estímulo o estrés (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 2006).

Los factores transcripcionales pueden dividirse entre constitutivos e inducibles. En términos generales, los constitutivos son aquellos que regulan la expresión basal de los genes que codifican para todas las proteínas estructurales o de mantenimiento, es decir, las enzimas y los componentes proteicos presentes en todas las células y que son fundamentales para la función celular en general. Los factores de transcripción inducibles son aquellos que regulan la expresión de genes que solamente se utilizan en ciertos tipos celulares o en ciertos momentos de la vida de la célula (López-Bojorquez, 2004).

La comprensión de los mecanismos moleculares a través de los cuales las plantas perciben el estrés y transducen esta señal dentro de las células para generar respuestas adaptativas es vital para diseñar estrategias que permitan mejorar la tolerancia al estrés de los cultivos. La vía de transducción de señales comienza con la percepción de la señal a través de sensores aún no identificados, y continúa con la generación de segundos mensajeros como el calcio, fosfoinosítidos, especies reactivas del oxígeno (EROs) y la activación de cascadas de fosforilación de proteínas. Estas vías tienen como blanco final factores de transcripción que controlan la expresión de genes en respuesta al estrés. Los productos de estos genes contribuyen a proteger y reparar las células del daño causado por el estrés, o bien participan en la generación de moléculas regulatorias, principalmente el ABA (Muñiz-García & Capiati, 2011).

El estrés hídrico regula los factores de trans-

cripción por inducción de genes, activación de proteínas, o degradación a través del sistema de proteosoma. De esta manera, los factores de transcripción actúan como llaves moleculares para la expresión de los genes en respuesta al estrés (Muñiz García & Capiati, 2011). Muchos de estos factores han sido utilizados en diversas especies vegetales para incrementar la tolerancia al estrés hídrico (Muñiz-García & Capiati, 2011).

Los genomas de las plantas contienen un importante número de FTs, por ejemplo, en *Arabidopsis* alrededor del 5,9% de su genoma codifica para unos 1599 FTs. La mayoría de estos FTs pertenecen a unas pocas y grandes familias multigénicas. Los miembros individuales de cada familia frecuentemente responden diferentemente al estímulo de distintos estrés (García-Morales *et al.*, 2013). La sobreexpresión de muchos de estos genes en plantas confiere tolerancia al estrés hídrico. Algunos factores de transcripción son regulados a nivel de la transcripción y otros por modificación post-traducciona (Hirayama & Shinozaki, 2010).

Se han identificado cuatro grupos principales de factores de transcripción involucrados en la regulación de genes de respuesta al estrés hídrico en plantas: ABRE/ABF, MYC/MYB, DREB/CBF y NAC Y ZF-HD. Dos que responden al ABA y dos independientes del ABA (Shinozaki & Yamaguchi-Shinozaki, 1997).

Los factores ABRE/ABF y MYC/MYB se expresan en respuesta al ABA. La sobreexpresión de genes ABRE/ABF aumentó la tolerancia al estrés hídrico en *Arabidopsis* (Muñiz-García & Capiati, 2011). Por otra parte, los factores DREB/CBF y NAC y ZF-HD cumplen una importante función en las vías de señalización independientes del ABA (Muñiz-García & Capiati, 2011).

## VII. AMINOÁCIDOS

La prolina es un aminoácido proteínogénico, con una conformación rígida, y es esencial para el metabolismo primario. Numerosos estudios han mostrado que el contenido de prolina aumenta bajo diferentes condiciones de estrés. La acumulación de prolina en plantas estresadas tiene una función de protección, sin embargo en

la relación entre acumulación de prolina y tolerancia al estrés en plantas los resultados son variados.

Por mucho tiempo se consideró a la prolina como un osmolito. Sin embargo, la acumulación de prolina afecta la tolerancia al estrés de diferentes maneras. La prolina puede tener función de molécula chaperona capaz de proteger la integridad y el plegamiento de las diferentes enzimas.

Por otra parte, varios estudios han atribuido una característica antioxidante a la prolina, disminuye las EROs, activa las enzimas involucradas en la detoxificación de EROs, tales como catalasas, peroxidasas y superoxidodismutasa, también posee ciertas funciones regulatorias y actúa como molécula señal (Szabados & Savouré, 2009).

La función de la prolina es: como osmolito, estabilización de macromoléculas, un destino para el exceso de reductantes y almacenamiento de carbono y nitrógeno para usar luego de transcurrido el déficit hídrico.

La prolina es considerada como un potente antioxidante y un inhibidor potencial de PCD. Por ello, la prolina puede ser considerada un antioxidante enzimático que animales, vegetales y microorganismos requieren para mitigar los efectos adversos de EROs.

Está bien documentado que luego de un estrés salino, sequía y metal ocurre una importante acumulación de prolina, debido a un aumento de la síntesis o disminución de la degradación.

La prolina libre actúa como un osmoprotector, estabilizador de proteínas, quelato de metales un inhibidor de LPO (Peroxidación Lípidos) y eliminador de  $\text{OH}^-$  y  $^1\text{O}_2$ . Por lo tanto la prolina no es sólo un importante señal redox, sino también un secuestrador de EROs formados ante condiciones de estrés (Gill & Tuteja, 2010).

La típica primera respuesta de todos los organismos vivos al déficit hídrico es el ajuste osmótico. Para contrarrestar el estrés hídrico, muchas plantas aumentan el potencial osmótico de las células mediante la síntesis y acumulación de solutos compatibles tales como prolina, y por esto, la principal enzima reguladora es la prolina oxi-

dasa (PROX). Una importante reducción en la oxidación de la prolina fue observada bajo condiciones de estrés. La prolina oxidasa transforma la prolina en glutamato. Esta enzima afecta el nivel de prolina libre (Shao *et al.*, 2008).

## VIII. CONCLUSIONES

El estado de conocimiento actual muestra la importancia de las proteínas en la tolerancia a la baja disponibilidad de agua, ya sea con una función estructural o con fines reguladores.

Aún quedan proteínas y funciones por dilucidar. Sin embargo, dado el avance de la Biología Molecular y la Ingeniería Genética, este saber, podrá ser utilizado en la generación de plantas tolerantes a la baja disponibilidad de agua, lo cual será un importante aporte a la producción agrícola en regiones con limitaciones hídricas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Apel K. & H. Hirt. 2004. Reactive Oxygen Species: Metabolism, Oxidative Stress and Signal Transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* 55: 373-399.
- Ashraf M. & M.R. Foolad. 2007. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environ. Exp. Bot.* 59: 206-216.
- Battaglia M. Y. Olvera-Carrillo, A. Garcarrubio, F. Campos & A. Covarrubias. 2008. The enigmatic LEA proteins and others hydrophilins. *Plant Physiol.* 148: 6-24.
- Bhatnagar-Mathur P., V. Vadez & K.K. Sharma. 2008. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Rep.* 27: 411-424.
- Bray E.A. 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.* 103: 1035-1040.
- Castagnino J.M. 2004. Premio Nobel de Química 2003. Las acuaporinas. *Acta Bioquim. Clin. Latinoam.* 38: 443-445.
- Cuevas-Velázquez C.L. & A. A. Covarrubias-Robles. 2011. Las proteínas desordenadas y su función: Una nueva forma de ver la estructura de las proteínas y la respuesta de las plantas al estrés. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 14: 97-105.
- Cushman J.C. 2001. Crassulacean acid metabolism. A plastic photosynthetic adaptation to arid environments. *Plant Physiol.* 127: 1439-

- 1448.
- Danon A., O. Miersch, G. Felix, R.G.L. Opden Camp & K. Apel. 2005. Concurrent activation of cell death-regulating signaling pathways by singlet oxygen in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 41: 68-80.
- Folkert A., E. Hoekstra, E.A. Golovina & J. Buitink. 2001. Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends Plant Sci.* 6: 431-438.
- García-Morales S., F.C. Gómez-Merino, L.I. Trejo-Téllez & E.B. Herrera-Cabrera. 2013. Factores de transcripción involucrados en respuestas moleculares de las plantas al estrés osmótico. *Rev. Fitotec. Mex.* 36: 105-115.
- Garay-Arroyo A., J.M. Colmenero-Flores, A. Gariarrubio, & A.A. Covarrubias. 2000. Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eucaryotes are common during conditions of water deficit. *J. Biol. Chem.* 275: 5668-5674.
- Gill S.S. & N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. Biochem.* 48: 909-930.
- Hachez C., A. Besserer, A.S. Chevalier & F. Chaumont. 2013. Insights into plant plasma membrane aquaporin trafficking. *Trends Plant Sci.* 18: 344-352.
- Hirayama T. & K. Shinozaki. 2010. Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J.* 61: 1041-1052.
- Hussain S.S., M.T. Lqbal, M.A Arif & M. Amjad. 2011. Beyond osmolytes and transcription factors: drought tolerance in plants via protective proteins and aquaporins. *Biol. Plant.* 55: 401-413.
- Langridge P., N. Paltridge & G. Fincher. 2006. Functional Genomics of abiotic stress tolerance in cereals. *Brief. Funct. Genomic Proteomic* 4: 343-354.
- López-Bojorquez L.N. 2004. La regulación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Un mediador molecular en el proceso inflamatorio. *Rev. Invest. Clín.* 56: 83-92.
- Miller D.P., R.E. Anderson & T.J. de Pablo. 1998. Stabilization of lactate dehydrogenase following freeze thawing and vacuum drying in the presence of trehalose and borate. *Pharm. Res.* 15: 1215-1221.
- Moreno L.P. 2009. Respuesta de las plantas al estrés por déficit hídrico. Una revisión. *Agron. Colomb.* 27: 179-191.
- Muñiz García M.N. & D.A. Capiati. 2011. Utilización de factores de transcripción como herramienta biotecnológica para incrementar la tolerancia a la sequía en plantas. *Rev. Quím. Viva* 10: 187-199.
- Nakashima K., Y. Fujita, N. Kanamori, T. Katagiri, T. Umezawa, S. Kidokoro, K. Maruyama, T. Yoshida, K. Ishiyama, M. Kobayashi, K. Shinozaki & K. Yamaguchi-Shinozaki. 2009. *Plant Cell Physiol.* 50: 1345-1363.
- Olvera-Carrillo Y., F. Campos, J.L. Reyes, A. Gariarrubio & A.A. Covarrubias. 2010. Functional analysis of the group 4 late embryogenesis abundant proteins reveals their relevance in the adaptive response during water deficit in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 154: 373-390.
- Raymond M.J. & N. Smirnov. 2002. Proline metabolism and transport in maize seedlings at low water potential. *Ann. Bot.* 89: 813-823.
- Reddy A.R., K.V. Chaitanya & M. Vivekanandan. 2004. Drought- induced responses of photosynthesis and antioxidant metabolism in higher plants. *J. Plant Physiol.* 161: 1189-1202.
- Reyes J.L., M.J. Rodrigo, J.M. Colmenero-Flores, J.V. Gil, A. Garay-Arroyo, F. Campos, F. Salamini, D. Bartels & A.A. Covarrubias. 2005. Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant Cell Environ.* 28: 709-718.
- Sato Y. & S. Yokoya. 2008. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Rep.* 27: 329-334.
- Schäffner A.R. 1998. Aquaporin function, structure, and expression: are there more surprises to surface in water relations? *Planta* 204: 131-139.
- Shao H., L. Chu, M. Shao, A.J. Cheruth & H-mei Mi. 2008. Higher plant antioxidants and redox signaling under environmental stresses. *C.R. Biologies* 331: 433-441.
- Shinozaki K. & K. Yamaguchi-Shinozaki. 1997. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol.* 115: 327-334.
- Szabados L. & A. Saviouré. 2009. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15: 89-97.

- Thapa G., M. Dey, L. Sahoo & S.K. Panda. 2011. An insight into the drought stress induced alterations in plants. *Biol. Plant.* 55: 603-613.
- Wang W., B. Vinocur & A. Altman. 2003. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218: 1-14.
- Waterer D., N.T. Benning, G. Wu, X. Luo, M. Gusta, A. McHughen & L.V. Gusta. 2010. Evaluation of abiotic stress tolerance of genetically modified potatoes (*Solanum tuberosum* cv. Desiree). *Mol. Breeding* 25: 527-540.
- Wise M.J. & A. Tunnacliffe. 2004. POPP the question: what do LEA proteins do? *Trends Plant Sci.* 9: 13-17.
- Yamaguchi-Shinozaki K. & K. Shinozaki. 2005. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci.* 10: 88-94.