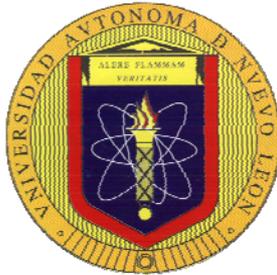


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Efecto de la inhibición de la trealasa por RNA antisentido sobre la tolerancia
a sequía en arroz (*Oryza sativa* L.)**

Por

Biól. Deyanira Quistián Martínez

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS
Con Especialidad en Biotecnología**

San Nicolás de los Garza, N. L. Julio, 2010

**Efecto de la inhibición de la trealasa por RNA antisentido sobre la tolerancia
a sequía en arroz (*Oryza sativa* L.)**

DIRECTOR EXTERNO

Dr. José Luis Cabrera Ponce

ASESORES EXTERNOS

Dr. Roberto Montes de Oca Luna

Dr. Juan José Peña Cabriaes

Dr. Andrés Adolfo Estrada Luna

**Efecto de la inhibición de la trealasa por RNA antisentido sobre la tolerancia
a sequía en arroz (*Oryza sativa* L.)**

COMITÉ DE TESIS

Dra. Yolanda Gutiérrez Puente

Director

Dr. Mario Morales Vallarta

Secretario

Dra. Lilia H Morales Ramos

Vocal

Dr. Carlos E. Hernández Luna

Vocal

Dra. Katiushka Arévalo Niño

Vocal

Dr. Rahim Foroughbakhch Pournavab

Suplente

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo durante la realización de los estudios de posgrado.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados-IPN Unidad Irapuato, por las facilidades otorgadas para la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. José Luis Cabrera Ponce, por la aceptación en su laboratorio para la estancia doctoral y por su constante apoyo, interés, dirección y discusión en la realización de este trabajo.

Al Dr. Roberto Montes de Oca Luna, por la confianza para el desarrollo de este trabajo y su vocación por la enseñanza en la investigación.

Al Dr. Andrés Estrada Luna por su apoyo e interés, así como su atinada dirección la cual fue decisiva para el cumplimiento de los objetivos planteados en este trabajo.

Al Dr. Juan José Peña Cabriales, por las facilidades y apoyo otorgado para la realización de este trabajo y cálida aceptación en su laboratorio.

Al Dr. Josué Altamirano Hernández, por su tiempo, enseñanza, apoyo y facilidades para la realización de este trabajo.

Al personal de Laboratorio de Transformación Genética de Plantas que me recibieron e integraron en su espacio, además del constante y eficiente apoyo técnico.

Al personal del Laboratorio de Microbiología Ambiental, por todas las facilidades y apoyo para el desarrollo de este trabajo, así como la agradable convivencia.

A todo el personal de CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato que proporcionaron apoyo para la realización de este trabajo, especialmente al personal de Invernaderos.

A todos mis compañeros y amigos de la Unidad de Manipulación Genética en la Facultad de Ciencias Biológicas UANL, que compartimos agradables experiencias personales y académicas que de alguna y otra manera me acompañaron durante mi formación.

A mi familia, pilar y motor indiscutible de todo esfuerzo realizado.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
3. HIPOTESIS	4
4. OBJETIVOS	5
4.1 Objetivo General	5
4.2 Objetivos Específicos.	5
5. ANTECEDENTES	
5.1 Origen e Historia del Cultivo del Arroz	6
5.2 Importancia Económica	6
5.3 Ecosistemas Arroceros de México	7
5.3.1 Riego por transplante	7
5.3.2 Riego por siembra directa	8
5.3.3 Temporal	8
5.3.4 Temporal con riegos de auxilio	8
5.4 Ciclo de Vida y Etapas de Desarrollo	8
5.4.1 Etapa vegetativa	9
5.4.2 Etapa reproductiva	9
5.4.3 Etapa de maduración	9
5.5 Factores Ambientales que Afectan el Cultivo del Arroz	10
5.5.1 Temperatura	10
5.5.2 Radiación solar	11
5.5.3 Agua	11
5.6 Características del Cultivo de Arroz Sometido a Estrés Hídrico	11
5.6.1 Fisiología del arroz en condiciones de estrés hídrico	12
5.6.2 Afectaciones en el rendimiento en condiciones de sequía	12
5.7 Resistencia a Sequía	14

5.7.1	Escape	14
5.7.2	Evitación	15
5.7.3	Tolerancia	15
5.7.4	Recuperación	15
5.8	Biotecnología Aplicada al Mejoramiento Genético del Arroz	
5.8.1	Mejoramiento genético de la resistencia a sequía en arroz	16
5.8.1.1	Factores de transcripción	17
5.8.1.2	Proteínas reguladoras	18
5.8.1.3	Sustancias osmoreguladoras	18
5.8.2	Transformación genética de arroz	20
5.8.2.1	Sistema de protoplastos	21
5.8.2.2	Sistema de <i>Agrobacterium</i>	21
5.8.2.3	Sistema de biobalística	22
5.9	Metabolismo y Señalización de Azúcares en Plantas	23
5.9.1	Sistemas de Monitoreo	25
5.9.2	Mecanismos de Respuesta a Estrés Abiótico	26
5.9.3	Azúcares en la Tolerancia a Estrés	27
5.9.3.1	Fructanos	28
5.9.3.2	Oligosacáridos de Rafinosa	28
5.9.3.3	Azúcares Alcohol	28
5.9.3.4	Prolina	29
5.9.3.5	Trealosa	29
5.10	Trealosa	29
5.10.1	Papel de la Trealosa en la Naturaleza	30
5.10.1.1	Protección contra la deshidratación	30
5.10.1.2	Protección contra el calor	31
5.10.1.3	Protección contra el frío	31
5.10.1.4	Estabilización de membranas celulares	31
5.10.1.5	Regulador metabólico y/o molécula de señalización	31
5.10.2	Mecanismo de acción	32
5.10.3	Biosíntesis en plantas	33
5.10.3.1	Homología de genes biosintéticos	34
5.10.4	Efectos fisiológicos del metabolismo de trealosa	35
5.10.4.1	Crecimiento y desarrollo	35
5.10.4.2	Metabolismo de carbón	37
5.10.5	Regulación del Metabolismo de Trealosa	39
5.10.6	Biosíntesis en condiciones de estrés abiótico	39
5.10.7	Aplicación del metabolismo de la trealosa en el mejoramiento de cultivos	40
5.11	Trealasa	41
5.11.1	Isoformas	41

5.11.1.1	Trealasa neutral	42
5.11.1.2	Trealasa acida	42
5.11.2	Trealasa en plantas	42
5.11.3	Efecto de activadores e inhibidores	44
5.11.4	Implicaciones en el metabolismo de carbohidratos	45
5.11.5	Actividad enzimática bajo estrés abiótico	45
6.	METODOLOGIA	
6.1	Material Vegetal	46
6.1.1	Arroz (<i>Oryza sativa</i> subsp <i>Indica</i>)	46
6.1.2	Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	46
6.2	Acidos Nucleicos	46
6.2.1	Vectores de expresión de RNA antisentido de trealasa.	46
6.2.2	Preparación de DNA	47
6.3	Análisis de la Funcionalidad de Secuencia Antisentido en Tabaco	46
6.3.1	Germinación de semillas transgénicas de tabaco en medios selectivos	47
6.4	Manejo <i>in vitro</i> del Callo Embriogénico y Plántulas de Arroz	48
6.4.1	Desinfección de semillas de arroz	48
6.4.2	Inducción de callo embriogénico	48
6.4.3	Cinética de crecimiento de callo embriogénico	49
6.4.4	Preparación de tejido para transformación y selección	49
6.4.5	Regeneración a plántulas a partir de callo embriogénico	49
6.4.6	Enraizamiento y aclimatación de plántulas regeneradas	49
6.5	Transformación de Callo Embriogénico de Arroz por Biobalística	50
6.5.1	Preparación de micropartículas.	50
6.5.2	Preparación de micropartículas/DNA para bombardeo	50
6.5.3	Condiciones de bombardeo	51
6.5.4.	Selección de material transformado	51
6.6	Caracterización de las Plantas Transgénicas de Arroz	51
6.6.1	Análisis de expresión de β -glucoronidasa	51
6.6.2	Análisis del transgén por PCR	51
6.6.2.1	Extracción de DNA	52
6.6.2.2	Prueba de PCR	52
6.7	Análisis de Actividad Trealasa	52
6.7.1	Preparación de extracto crudo	52
6.7.2	Cuantificación de proteínas	53
6.7.3	Reacción enzimática	53
6.7.4	Cuantificación de glucosa	53

6.8	Análisis de Tolerancia a Estrés Abiótico	53
6.8.1	Determinación del porcentaje de capacidad de campo	54
6.8.2	Determinación del contenido relativo de agua	54
6.8.3	Determinación de actividad fotosintética	55
6.9	Análisis del Contenido de Carbohidratos de Raíz	55
6.9.1	Colecta y almacenamiento de material vegetal	55
6.9.2	Extracción de carbohidratos.	55
6.9.3	Análisis y cuantificación de carbohidratos solubles	55
6.9.3.1	Derivatización	55
6.9.3.2	Identificación por GC-MS	56
6.9.4	Análisis del contenido de almidón	56
6.9.4.1	Digestión de almidón	56
6.10	Análisis Estadístico	56
7.	RESULTADOS	
7.1	Análisis de funcionalidad de secuencia Antisentido en Tabaco	57
7.2	Manejo <i>in vitro</i> de Tejido Embriogénico y Plántulas de Arroz	58
7.2.1	Inducción de callo embriogénico y transformación.	58
7.2.2	Análisis de expresión transitoria de β-glucoronidasa	61
7.2.3	Regeneración de plántulas de arroz	62
7.3	Micropropagación y Cultivo de Arroz en Invernadero	62
7.4.	Detección del Transgen en Plantas Transformadas	65
7.5	Análisis de Actividad Trealasa	67
7.5.1	Actividad enzimática en plantas tipo silvestre	67
7.5.2	Actividad enzimática de líneas transgénicas derivadas del genotipo Morelos A98	67
7.5.3	Actividad enzimática en líneas transgénicas derivadas del genotipo Temporalero A95	68
7.6.	Análisis del Contenido de Trealosa	69
7.6.1.	Contenido de trealosa en plantas transgénicas del genotipo Morelos A98	70
7.6.1.1	Perfil de carbohidratos no estructurales	71
7.6.2	Contenido de trealosa en plantas transgénicas del genotipo Temporalero A95	72
7.6.2.1	Perfil de carbohidratos no estructurales	73
7.7	Morfología de plantas con inhibición de Actividad Trealasa	74
7.7.1	Plantas transgénicas derivadas del genotipo Morelos A98	74

7.7.2 Plantas transgénicas derivadas del genotipo Temporalero A95	76
7.8 Análisis de tolerancia a sequía	78
7.8.1 Tolerancia en líneas transgénicas del genotipo Morelos A98	78
7.8.2 Tolerancia de líneas transgénicas del genotipo Temporalero A95	79
7.9 Capacidad Fotosintética en Plantas Transgénicas	80
7.9.1 Parámetros fotosintéticos en plantas transgénicas derivadas del genotipo Morelos A98	80
7.9.2 Parámetros fotosintéticos en plantas transgénicas derivadas del genotipo Temporalero A95	82
8. DISCUSION	85
9. CONCLUSION	96
10. LITERATURA CITADA	98

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Plantas Transgénicas de Arroz para Incrementar la Resistencia a Sequía	19
II.	Evidencia del papel de la biosíntesis de la trealosa en la regulación de metabolismo de carbón en plantas	38
III.	Evaluación del proceso de transformación genética mediante biobalística de callos embriogénicos de arroz	61
IV.	Análisis de la actividad del gen reportero <i>uidA</i> (β -glucoronidasa)	61
V.	Respuesta del callo embriogénico a la aplicación de los diferentes reguladores de crecimiento en la fase de regeneración a plántulas	63
VI.	Eficiencia del uso de Reguladores de Crecimiento	64

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Ciclo de vida del arroz	10
2. Mecanismos de evasión y tolerancia a sequía en arroz	15
3. Aspectos de los métodos de transformación genética de plantas	23
4. Efectos metabólicos de los niveles de azúcar en órganos fuente y vertedero	24
5. Modelo de los procesos celulares de percepción y respuesta al estrés abiótico	27
6. Fórmula estructural de la trealosa.	30
7. Capacidad osmoprotectora de la trealosa	33
8. Vía biosintética de la trealosa en plantas	34
9. Esquema de casete de expresión de RNA antisentido y plásmido de selección	47
10. Metodología de la transformación genética por biobalística	50
11. Gráfica de la pérdida de agua de suelo en plantas de arroz bajo tratamiento de sequía	54
12. Análisis de funcionalidad de secuencia antisentido en tabaco	57
13. Fenotipos resistentes de plántulas de tabaco germinadas <i>in vitro</i> en medios osmóticos.	58
14. Cultivo de callo embriogénico de arroz	59
15. Sistema de transformación por biobalística	60
16. Proceso de selección de tejido transformado	60
17. Actividad <i>in vivo</i> del gen reportero <i>uidA</i> (β -glucoronidasa) en callo embriogénico de arroz	62
18. Respuestas morfogenéticas de callos embriogénicos en proceso de regeneración	64
19. Cultivo <i>in vitro</i> de arroz	65
20. Cultivo de arroz en invernadero	66
21. Detección del fragmento antisentido de trealasa por PCR en plantas de arroz	66
22. Actividad trealasa en arroz	67
23. Actividad trealasa en plantas transgénicas del genotipo Morelos A98	68
24. Actividad trealasa en plantas transgénicas del genotipo Temporalero A95	69
25. Cromatograma de azúcares presentes en raíz	70
26. Nivel de trealosa en raíz de plantas transgénicas del genotipo Morelos A98	71
27. Perfil de carbohidratos no estructurales en líneas transgénicas del genotipo Morelos A98	72

28. Nivel de trealosa en raíces de plantas transgénicas del genotipo Temporalero A95	73
29. Perfil de carbohidratos no estructurales en líneas transgénicas del genotipo Temporalero A95	74
30. Características morfológicas de plantas transgénicas del genotipo Morelos A98 sometidas a sequía	75
31. Producción de biomasa en líneas transgénicas del genotipo Morelos A98	76
32. Características morfológicas de plantas transgénicas del genotipo Temporalero A95 sometidas a sequía	77
33. Producción de biomasa en líneas transgénicas del genotipo Temporalero A95	78
34. Análisis de tolerancia a sequía en líneas transgénicas del genotipo Morelos A98	79
35. Análisis de tolerancia a sequía en líneas transgénicas del genotipo Temporalero A95	80 81
36. Fotosíntesis neta de líneas transgénicas del genotipo Morelos A98	
37. Conductancia y resistencia estomática de líneas transgénicas del genotipo Morelos A98	82
38. Fotosíntesis neta en líneas transgénicas del genotipo Temporalero A98	83
39. Conductancia y resistencia estomática de líneas transgénicas genotipo Temporalero A95	84

LISTA DE ABREVIATURAS

Ade	Adenina
BAP	Benzil amino purina
BD	Borde derecho
BI	Borde izquierdo
BSA	Suero de Albúmina Bovina
° C	Grados Centígrados
CaCl	Cloruro de Calcio
CaMV 35S	Promotor 35S del Virus del mosaico de la coliflor
CC	Capacidad de campo
Cl	Cloro
CLF	Claforán
CRA	Contenido Relativo de Agua
2,4-D	Acido 2,4 dicloro fenoxiacético
DNA	Acido Desoxirribonucleico
DPU	Difenilurea
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente ligado a Enzima
GA₃	Acido giberélico
GLU	Glucosa
gmn	Germinación
GOP/POD	Glucosa oxidasa/peroxidasa
GUS	Glucoronidasa
µgr	Microgramos
Ha	Hectárea
Hg	Mercurio
<i>hptII</i>	Higromicina fosfotransferasa
Hrs	Horas
2-i-P	2-isopentil alil aminopurina
KIN	Cinetina
Kn	Kanamicina
µl	Microlitros
M	Molar
MA98	Morelos A98
md	Maduración de embriones
MES	Acido 2-N[Morpholino] EtanoSulfónico
mgr	Miligramos

ml	Mililitros
min	Minutos
mM	Milimolar
MS	Murashige y Skoog
NAA	Acido naftalen acético
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
nec	Necrosis
nm	Nanómetro
NOS polyA	Señal de Poliadenilación de la nopalina sintetasa.
NOS ter	Terminador de Nopalina sintetasa
nptII	Neomicina fosfotransferasa II
ox	oxidación
PEG	Polietilenglicol
PF	Peso fresco
pH	potencial de Hidrógeno
PHLO	Floroglucinol
plt	Plántulas
PS	Peso Seco
psi	Unidad de presión básica del sistema ingles 144 lb/ft ²
PT	Peso túrgido
rd29A	Promotor de <i>Arabidopsis</i> inducible por estrés
RNasaA	Ribonucleasa A
rpm	Revoluciones por minuto
SAC	Sacarosa
SCE	Suspensiones de Células Embriogénicas
SDS	Dodecil sulfato de sodio
segs	segundos
T°	Temperatura
TA95	Temporalero A95
Ton	Tonelada
TPP	Trealosa-6-fosfato fosfatasa
TPS	Trealosa-6-fosfato sintetasa
TRE	Trealosa
TREas	Fragmento antisentido de trealasa
T0	Planta transformada genéticamente
T-6-P	Trealosa-6-fosfato
uidA	Beta-glucoronidasa
X-GLUC	5-Bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucoronido

RESUMEN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es un alimento básico para más de la mitad de la población mundial. Considerando la importancia del arroz como cultivo alimenticio, la obtención de variedades mejoradas con características agronómicas que impacten positivamente en la resistencia a condiciones desfavorables, incrementará la autosuficiencia alimentaria de la población. La sequía es el principal factor limitante para el incremento de la productividad agrícola mundial, y el mejoramiento de variedades resistentes a sequía involucra la manipulación de un sistema de caracteres complejos por lo que el desarrollo de plantas con mejoras en la resistencia a estrés hídrico es una necesidad latente. Estudios recientes del metabolismo de la trealosa han puesto en evidencia la capacidad generalizada de las plantas de sintetizarla y el importante papel que tiene en la resistencia a estrés hídrico. Este proyecto parte de la hipótesis de que la inhibición por RNA antisentido del gen de la trealasa incrementa los niveles de trealosa y se confiere tolerancia a estrés abiótico. El objetivo principal de este trabajo consistió en analizar el efecto de la inhibición del gen de la trealasa por RNA antisentido en la resistencia a estrés hídrico en dos variedades mexicanas de arroz con distinta tolerancia a sequía (riego y secano). La metodología propuesta para tal fin consistió en obtener un cultivo de callo embriogénico de arroz para su transformación por el método de biobalística con vectores de expresión de RNA antisentido dirigidos a la trealasa. Las plantas transformantes se obtuvieron por germinación de embriones somáticos resistentes a higromicina en medios suplementados con reguladores de crecimiento y sometidas a un proceso de propagación, enraizamiento y aclimatación a condiciones de Invernadero. El material obtenido se analizó por PCR y funcionalidad de β -glucoronidasa como gen reportero; así mismo fue analizada la disminución de actividad trealasa en condiciones *in vitro*. Las plantas en condiciones de invernadero fueron sometidas a un periodo estrés hídrico al final del cual fue analizado el contenido de azúcares, CRA de hoja, fotosíntesis así como distintos parámetros fenológicos como producción de biomasa y hábitos de crecimiento. Las líneas transgénicas mostraron un incremento en la concentración de trealosa presente en raíz en condiciones de sequía, siendo mayor la capacidad de acumulación de la variedad de arroz tipo secano (resistente a sequía), donde también incrementaron la biomasa. Los niveles de trealosa alcanzados para las plantas transgénicas fueron de 780 y 870 $\mu\text{gr}/\text{gr}$ PS como valores máximos para las variedades de riego (Morelos A98) y secano (Temporalero A95) respectivamente. Esta acumulación de trealosa condujo a un incremento significativo en la capacidad fotosintética de las líneas transgénicas en condiciones de riego y aumenta en condiciones de sequía en líneas derivadas de Morelos A98 explicado por altos niveles de CRA. En plantas transgénicas derivadas de Temporalero A95 el incremento de la actividad fotosintética y alto CRA se ve afectado por el tratamiento de sequía aplicado. De esta manera fue posible concluir que la inhibición de la trealasa conduce a un incremento de trealosa en condiciones de sequía, y que la tolerancia de la planta a las condiciones de estrés se ve incrementada manteniendo altos nivel de fotosíntesis.

INTRODUCCION

El incremento explosivo de la población mundial, junto con el continuo deterioro de las tierras arables, la escasez de agua y el incremento en el estrés ambiental, resultan en serios problemas para la producción agrícola y seguridad alimentaria mundial. A pesar de los esfuerzos enfocados para mejorar los cultivos principales por medio del mejoramiento tradicional en su resistencia a diferentes tipos de estrés abiótico, como la sequía, la salinidad y las temperaturas extremas, los éxitos han sido limitados. La falta de un progreso deseable en esta área se atribuye al hecho de que la tolerancia al estrés abiótico es una característica compleja influenciada por la expresión coordinada y diferencial de una red de genes.

El estrés abiótico puede afectar directa o indirectamente el estado fisiológico de un organismo alterando su metabolismo, crecimiento y desarrollo. Una respuesta común de los organismos al estrés por sequía salinidad y temperaturas extremas, incluye la síntesis y acumulación de componentes osmoprotectores conocidos como solutos compatibles. Estos son compuestos relativamente pequeños que incluyen aminoácidos y sus derivados, polioles, azúcares, metilaminas, etc. Estos compuestos denominados osmolitos son considerados como estabilizadores de las proteínas y estructuras celulares en condiciones de estrés. Uno de estos compuestos es la trealosa, un disacárido de glucosa que desempeña un importante papel fisiológico como protector de estrés abiótico en una gran cantidad de organismos, incluyendo bacterias, levaduras e invertebrados. En el Reino Vegetal, la mayoría de las especies no acumulan cantidades considerables de trealosa a excepción de las plantas conocidas como plantas de resurrección *Selaginella lepidophylla*, cuya característica es ser altamente resistente a la sequía.

Con el estudio del metabolismo de la trealosa y el descubrimiento de genes homólogos para su biosíntesis en *Selaginella*, *Arabidopsis* y otras plantas se sabe que la habilidad de sintetizar trealosa está ampliamente distribuida entre las diferentes especies vegetales. Estas investigaciones han propiciado la realización de trabajos dentro del área de la ingeniería genética de plantas para lograr la sobreproducción y acumulación de trealosa y con ello lograr fenotipos interesantes en la tolerancia a estrés abiótico. Sin embargo los primeros trabajos mostraron los aspectos negativos de la acumulación de intermediarios de la biosíntesis de trealosa así como la degradación mediante la actividad hidrolítica de la enzima trealasa, por lo que la acumulación de del azúcar no fue posible. A pesar de lo anterior se obtuvieron resultados positivos de adquisición de diferentes niveles de tolerancia a estrés por sequía, salinidad y bajas temperaturas; a la par que se ha descubierto el importante papel de la trealosa-6-fosfato, intermediario del metabolismo, como molécula de señalización en el metabolismo de carbohidratos en plantas conduciendo a una mejora en la capacidad fotosintética de la planta.

Debido a los resultados positivos de adquisición de tolerancia al estrés abiótico con la manipulación del metabolismo de la trealosa, se han continuado las investigaciones con el fin de desarrollar estrategias que lleven al incremento de los niveles de acumulación del azúcar y con ello los de tolerancia en las especies estudiadas, con el objetivo final de obtener tales efectos en cultivos de importancia agronómica.

Considerando la importancia del arroz en nuestra alimentación, es oportuno manipular la concentración de trealosa evaluar sus efectos en este cultivo que resulte en el desarrollo de variedades con una mejor tolerancia al estrés abiótico. Esto brindará la oportunidad de la siembra de arroz en áreas donde normalmente no se cultiva resultando en un impacto social y económico positivo y si se logra conferir un aumento en la capacidad fotosintética y mayor producción, dicha tecnología tendrá un valor agregado.

HIPOTESIS

La inhibición por RNA antisentido del gen de la trealasa y con ello la acumulación de trealosa confiere tolerancia a estrés hídrico en arroz.

OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Analizar el efecto de la inhibición del gen de la trealasa por RNA antisentido sobre la tolerancia a sequía en arroz.

4.2. Objetivos Específicos

1. Analizar la funcionalidad de la secuencia antisentido en tabaco.
2. Obtener un cultivo de callo embriogénico de Arroz.
3. Transformar el cultivo con vectores de expresión del RNA antisentido por el método de biobalística.
4. Caracterizar las plantas transgénicas de arroz obtenidas.
5. Realizar ensayos de tolerancia a sequía en las plantas transgénicas.

ANTECEDENTES

5.1 Origen e Historia del Cultivo del Arroz

El arroz es uno de los cultivos más antiguos en la agricultura, puesto que se domesticó hace miles de años en Asia y en África, se extendió por China y por toda Asia 3 000 años antes de nuestra era y durante el último milenio se ha introducido progresivamente en el resto de los continentes. Si bien se trata de una planta de origen tropical, se encuentra totalmente adaptada a diversos ambientes, desde los desiertos egipcios o australianos hasta alturas de 2 400 metros sobre el nivel del mar en Nepal o los altiplanos andinos.

Se cultiva principalmente en agua mediante el sistema de campos inundados (el 56% del total cultivado: todo el de Europa, de Norte América, de Oceanía y más del 50% del de Asia), pero también puede efectuarse en seco, en lugares bajos donde las lluvias son abundantes (Suramérica, África y en diversas zonas de Asia) o bien en “tierras altas”. En la parte baja de los grandes ríos de Asia (Bangladesh, delta del Mekong, etc.) se cultivan los arrozales flotantes, capaces de vivir a una cierta profundidad en el agua. De hecho, el agua en el cultivo del arroz actúa más impidiendo por gravedad el ascenso capilar de las sales de las capas freáticas más o menos superficiales que proporcionando sustento líquido para una elevada evapotranspiración de la planta (Franquet y Borràs 2006).

Las 25 especies conocidas aproximadamente del género *Oryza* se encuentran distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales de Asia, Norte y Sur de Australia y Suramérica. Las variedades que se cultivan en la mayoría de los países pertenecen al tipo *Oryza*, que cuenta con una veintena de especies, de las cuales solamente dos presentan un interés agrícola para el hombre. *Oryza sativa* (arroz común asiático y presente en la mayoría de los países productores de arroz en el mundo), originario de Extremo Oriente al pie del Himalaya. Esta dio origen por el extremo chino a la subespecie *O. sativa Japonica* y del extremo indio la subespecie *O. sativa Indica*. La gran mayoría de las variedades que se cultivan pertenecen a esta subespecie, que se caracteriza por su plasticidad y por su calidad culinaria (Franquet y Borràs 2006).

5.2 Importancia Económica.

El arroz es uno de los productos agrícolas cuyo cultivo y consumo más auge ha experimentado en los últimos años. Es el recurso alimenticio más utilizado por los países pobres en su alimentación y la demanda en los países ricos aumenta cada año. En la mayoría de los principales países productores de arroz se produce para el consumo interno. Es precisamente en Asia donde están los seis primeros productores de arroz del mundo: China,

India, Indonesia, Vietnam, Bangladesh y Tailandia. Son además de grandes productores, grandes consumidores de dicho cereal de verano, por lo que pocos de estos países se encuentran entre los más exportadores, como es el caso de China e India que, aunque juntos acaparan el 60% de la producción mundial, sólo exportan el 1% de su propia producción, dedicando el resto al consumo interno. El comercio del arroz es pequeño comparado con el de otros productos agrícolas; así, en la primera mitad de los años 90 del pasado siglo, ha sido del 4% sobre el total de la producción, mientras que en el caso de otros productos como el trigo, el comercio mundial ha representado en el mismo período un 18% con respecto a la producción mundial (Franquet y Borràs 2006).

Según las últimas estimaciones de la FAO, la producción arrocerera aumentó en 2007 un uno por ciento hasta alcanzar los 650 millones de toneladas. Se trata del segundo año consecutivo en el que el crecimiento de la producción será menor que el crecimiento de la población, con el resultado de una disminución de la producción de arroz per cápita. Actualmente se prevé que el comercio internacional de arroz alcance los 29.9 millones de toneladas en 2008, 1.1 millones de toneladas por debajo de la estimación revisada de 2007. Las dificultades de abastecimiento a las que podrían enfrentarse la mayoría de los países exportadores hasta el último trimestre del año y las correspondientes restricciones sobre las exportaciones son factores determinantes para la reducción prevista en el comercio de arroz en 2008 (FAO 2008).

5.3 Ecosistemas Arroceros de México

A nivel mundial, se cultivan 80 millones de hectáreas de arroz en condiciones de riego, equivalente al 54% del área arrocerera, en las que se produce el 75% del total de grano. Se cultivan también alrededor de 17.3 millones de hectáreas de arroz de temporal, 12% del total cultivado, que aportan el 4% de la producción total de grano. (Osuna 2001).

En México el arroz se cultiva desde el Noroeste, en los Mochis, Sinaloa; Noreste, en el distrito de riego de Las Animas, en Tamaulipas, hasta el Sureste del país, en Chiapas. La mayor parte del arroz cultivado en el Norte y el Centro, se cultiva en condiciones de riego, bajo siembra directa o trasplante, mientras que la mayoría del arroz que se cultiva en el Sur es de temporal y siembra directa. La altitud de los sitios en los que se produce el arroz en nuestro país va de unos cuantos metros en muchos de los estados productores, hasta 1 400 m snm en Malinalco, estado de México, pasando por altitudes de 900 a 1 300 m snm en Morelos y Guerrero (Osuna 2001). Los sistemas arroceros que actualmente se manejan en México de acuerdo a Tavitas y Hernández (2000), son:

5.3.1 Riego por Trasplante (RT)

Es el sistema de cultivo en el que casi todas las labores todavía se efectúan a mano, desde el establecimiento del almácigo hasta la cosecha. El agua para el riego del cultivo en algunas áreas proviene de manantiales, o de pequeñas presas en otras zonas. Con el sistemas RT se estableció el cultivo del arroz de la subespecie *Indica* en el estado de Morelos en 1836, de donde posteriormente fue llevado a otras áreas del país; actualmente el cultivo de arroz RT se

efectúa en la región central de México, centro de Veracruz, Valle de Apatzingán, Michoacán y centro de Jalisco.

5.3.2 Riego por Siembra directa (RSD)

Sistema de cultivo altamente tecnificado, en que la siembra de la semilla se efectúa directamente en el terreno, ya sea en líneas con máquinas terrestres, o “al voleo” con “voleadoras”, a mano o con avioneta agrícola. El resto de las operaciones: control de malezas, plagas, y fertilización se efectúan con avioneta; la cosecha se realiza con máquinas combinadas convencionales, donde el agua para el riego proviene de presas de almacenamiento. El cultivo de arroz RSD en México se lleva a cabo principalmente en el noreste (Sinaloa y Nayarit), occidente (Colima y costa de Jalisco) y noreste (área de las Huastecas, que comprenden sur de Tamaulipas, norte de Veracruz y oriente de San Luis Potosí).

5.3.3 Temporal (T)

El que depende del agua de lluvia, desde que gemina la semilla y a través de todas las etapas fenológicas de las plantas hasta la maduración del grano. En México este sistema de cultivo se efectúa en las entidades del trópico húmedo del sureste (Veracruz, Oaxaca, Chiapas y Campeche).

5.3.4 Temporal con riegos de Auxilio (TRA)

Difiere del sistema de temporal, común, porque el cultivo puede recibir riegos de auxilio donde se cuenta con agua almacenada proveniente de algunas microcuencas o de pozos aledaños al cultivo, durante la ocurrencia de sequía principalmente en las etapas reproductivas de las plantas.

La escasez de agua para el cultivo de arroz en nuestro país es probablemente el factor limitante más importante en las zonas de riego. El estado de Sonora fue durante varios años en la primera mitad de este siglo, el principal productor de arroz en nuestro país. Debido a la escasez de agua, en los años 50's dejó de cultivarse por completo. Posteriormente, Sinaloa se convirtió en el principal productor de arroz de riego, llegando a cultivarse hasta 110 523 has en 1985. Debido a una aguda escasez de agua, en el ciclo Primavera-Verano en 1996 no se cultivó una sola hectárea de arroz y en los últimos años se han cultivado menos de 4 000 has a nivel estatal. En Morelos llegaron a cultivarse hasta 12 000 ha en algunos años de la década de los 60's. Debido al problema de escasez de agua, combinado con el de altos costos de producción, la superficie se redujo paulatinamente hasta estabilizarse alrededor de 3 500 has en los últimos 5 años. (Osuna, 2001)

5.4 Ciclo de Vida y Etapas de Desarrollo

Las plantas de las variedades cultivadas de arroz completan su ciclo de vida en períodos que van de 3 a 7 meses. Las variedades que alcanzan su maduración en tres meses son consideradas como muy precoces, mientras que aquellas que lo hacen en 7 meses, se

consideran muy tardías. Independientemente de la duración del ciclo, las plantas de arroz pasan por dos etapas secuenciales durante su crecimiento y desarrollo: la etapa vegetativa y la etapa reproductiva. La etapa reproductiva a su vez se divide en las etapas pre-floración y post-floración, conocida esta última como etapa de maduración.

El rendimiento potencial de grano se define primariamente en la etapa de pre-floración, pero el rendimiento real finalmente alcanzado se define en la etapa de maduración. Por esta razón, desde el punto de vista agronómico se considera conveniente dividir el ciclo de vida de la planta de arroz en tres etapas: vegetativa, reproductiva y de maduración (Osuna 2001).

5.4.2 Etapa Vegetativa

Inicia con la germinación de la semilla y termina cuando comienza la formación del primordio panicular. Se caracteriza esencialmente por el amacollamiento activo, el incremento gradual en altura y la emergencia de hojas en intervalos regulares. El amacollamiento activo sigue hasta alcanzar un máximo número de tallos, después de lo cual se presenta una reducción en la cantidad de tallos hasta alcanzar un valor constante. Algunos de los tallos que sobreviven no llegan a formar una panícula, por lo que son llamados tallos improductivos.

La etapa vegetativa se divide en etapa vegetativa básica y etapa vegetativa retardada o sensible al foto periodo. La primera es insensible a la duración del día y termina una vez que la planta puede iniciar la formación del primordio panicular, al presentarse días cortos. La etapa vegetativa retardada tiene una duración variable y es la responsable de las diferencias en la duración del ciclo de vida de las variedades fotosensibles.

5.4.3 Etapa Reproductiva

Esta etapa inicia con la formación del primordio panicular, lo cual generalmente ocurre muy próximo en tiempo al momento de máximo amacollamiento, unos días antes o unos días después. La etapa reproductiva se caracteriza por la elongación de los tallos, la reducción en el número de tallos, la emergencia de la hoja bandera, el embuche, la excerción o emergencia de la panícula y la floración. En la mayoría de las variedades, la excerción de la panícula ocurre alrededor de 30 días después del inicio del primordio panicular. A la fase de emergencia de panículas se le conoce también como antesis o floración, ya que esta última ocurre desde el momento mismo en que la panícula emerge, o cuando mucho al día siguiente (Yoshida 1981).

Desde el punto de vista agronómico, se considera que la planta se encuentra en la etapa de floración cuando el 50% de las panículas han emergido. En una espiguilla individual, se le conoce como antesis o floración a la serie de eventos que ocurren entre la apertura y el cierre de dicha espiguilla. Al inicio de la antesis, la lema y la palea se abren en la porción del ápice, luego los filamentos se elongan y las anteras emergen, después de lo cual la lema y la palea se cierran dejando fuera a las anteras.

5.4.3 Etapa de Maduración

La fase de maduración sigue a la fertilización de espiguillas (antesis o floración). Agronómicamente se considera que esta etapa se extiende desde la floración hasta el momento en que el grano alcanza su máximo peso. Su duración en los trópicos es más o menos constante, alrededor de 30 días, mientras que en las zonas templadas puede durar hasta 65 días. En términos prácticos se le subdivide en las etapas de grano lechoso, masoso, sazón y maduro. Esta fase se caracteriza por la senescencia de las hojas y por el crecimiento del grano, manifestado éste por el aumento en tamaño y peso, además de los cambios de color.

Las etapas de desarrollo descritas atrás son básicamente las mismas en los sistemas de trasplante y siembra directa. Las diferencias en la duración del ciclo total de vida en una variedad determinada se deben básicamente a la duración de la etapa vegetativa retardada o sensible al foto-periodo, como ocurre con las variedades Morelos que son altamente foto-sensitivas, ya que la duración de las etapas reproductiva y de maduración no varían considerablemente en una condición determinada. Además de la duración del día, la temperatura, o bien la combinación de duración del día y temperatura (foto-termo periodicidad), pueden afectar la duración del ciclo de vida de una variedad dada (Osuna 2001).

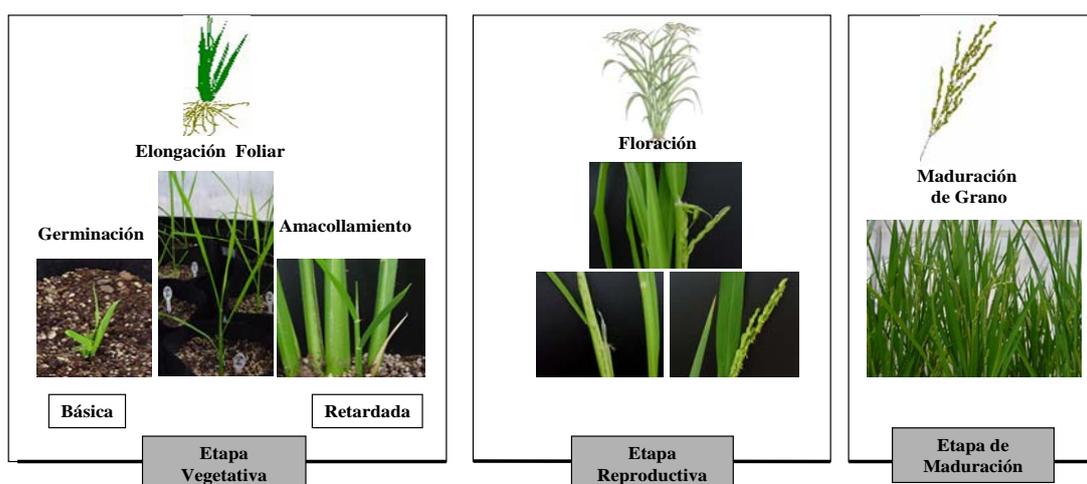


FIGURA 1. Ciclo de Vida del Arroz.

5.5 Factores Ambientales que Afectan el Cultivo del Arroz

En lo que se refiere al ambiente en general, los factores de clima juegan un papel decisivo en la producción de arroz, en primera instancia, el rendimiento del arroz está en función de interacciones complejas entre el genotipo cultivado y su ambiente, natural o modificado por las prácticas de manejo. La temperatura y la radiación solar son dos factores ambientales importantes en el cultivo del arroz; algunos autores señalan que una alta disponibilidad de agua es el requisito más crítico en condiciones de riego (Vargas 1985) y los efectos de la sequía como el primer factor limitante del desarrollo y rendimiento del arroz en condiciones de temporal.

5.5.1 Temperatura

La temperatura afecta tanto al crecimiento como al desarrollo del arroz. La temperatura afecta a la planta de arroz al menos en dos maneras: primero, se tienen temperaturas críticas bajas o altas que son las que definen en primera instancia los lugares en donde la planta puede completar su ciclo de vida. Segundo, dentro del intervalo de temperaturas críticas baja y alta, la temperatura influye en la tasa de desarrollo de las hojas y de las panículas, y de la tasa de maduración, determinando con ello la duración del crecimiento de una variedad determinada bajo cierto ambiente (Yoshida 1976).

El tiempo de desarrollo del arroz hasta la etapa de floración está determinado por la temperatura, la duración del día, y la sensibilidad de la planta a los dos factores. Después de la floración, la temperatura es el factor dominante que afecta la duración de la etapa de maduración. La temperatura óptima para el arroz decrece a medida que la etapa de desarrollo avanza de la fase vegetativa a la reproductiva. (Osuna 2001). En general, las variedades de la subespecie *Indica* están mejor adaptadas a las temperaturas altas en la etapa de maduración, mientras que las variedades de la subespecie *Japónica* requieren temperaturas bajas para una mejor maduración. (Osuna 2001)

5.5.2 Radiación Solar

El efecto de la radiación solar sobre el crecimiento y desarrollo de la planta de arroz depende de la etapa de desarrollo en que se encuentre. El sombreado durante la etapa vegetativa afecta sólo ligeramente al rendimiento de grano y sus componentes; durante la etapa reproductiva reduce significativamente el número de espiguillas. Sombreado durante la etapa de maduración se disminuye considerablemente el rendimiento de grano debido a la reducción del porcentaje de grano lleno (Yoshida 1981).

Si el abastecimiento de agua es adecuado, la temperatura y la radiación solar parecen ser los factores predominantes que afectan al rendimiento (Yoshida 1976). No debe perderse de vista, sin embargo, que los efectos positivos de estos dos importantes factores de clima se manifestarán sólo cuando se cultiva una buena variedad, a la que se aplica un manejo agronómico adecuado, y se controlan oportunamente las plagas y las enfermedades.

5.5.3 Agua

Ya se ha mencionado que si se cuenta con un abastecimiento suficiente de agua, la temperatura y la radiación solar determinan en buena medida el rendimiento de grano; sin embargo, en condiciones de temporal, si las temperaturas varían dentro del intervalo crítico, la lluvia el factor que más limita al rendimiento. A continuación se mencionarán los efectos de la deficiencia de agua en el cultivo del arroz.

5.6 Características del Cultivo de Arroz Sometido a Estrés Hídrico

Es muy conocido que el arroz es un alto consumidor de agua presentando una baja eficiencia en el uso de la misma, comparado con el sorgo y otros cereales, lo que implica una

relación de transpiración dos veces mayor (Yoshida 1982) y la producción de materia seca es proporcional a la cantidad de agua transpirada por la planta, lo que explica que el desarrollo y rendimiento del arroz en condiciones de secano guarda una alta relación con la cantidad y duración de la lluvia.

Es en la etapa de formación de la panícula donde la planta necesita mayor cantidad de agua; pues además de la requerida por sus tejidos, en este período la exigencia se incrementa en 80% para los granos y es en el 50% de floración donde se alcanza el mayor índice de área foliar; produciéndose un incremento en la intensidad transpiratoria, que no obstante reducirse a causa del estrés es superior a la alcanzada en la fase vegetativa.

La falta de agua durante la fase reproductiva según O'Toole y Chang (1979), presenta cuatro etapas donde los procesos de desarrollo son más sensibles a la sequía; no sólo en el cultivo de secano, sino en el de riego y son: iniciación de la panícula, desarrollo meiótico de los gametos, anthesis (fertilización) y la fase de llenado del grano. Se produce una reducción en la altura de la planta, retraso de excursión de la panícula, floración uniforme; se reduce el número de panículas fértiles y la eficiencia fotosintética, así como el número de granos llenos y se incrementa la esterilidad según informan Heenan et al. (1984) y Jha y Sahov (1988).

5.6.1 Fisiología del Arroz en Condiciones de Estrés Hídrico

La transpiración es un proceso que se controla inicialmente por la apertura y cierre de los estomas, determinado por la tensión de humedad del suelo, contenido de agua en el interior de la planta, resistencia estomática y condiciones ambientales (radiación solar, temperatura del aire y humedad relativa). En el momento que las extremidades de las raíces detectan el déficit hídrico en el suelo envían ácido abscísico a los estomas (Lasso 1991); cuya síntesis y translocación se aceleran hacia las partes aéreas de la planta, y los estomas bajo este estímulo se cierran reduciendo la transpiración.

La pérdida de agua por transpiración es inevitable pues la planta necesita abrir los estomas para facilitar la absorción de CO₂; la absorción es consecuencia de la pérdida de humedad por transpiración, indicando el equilibrio de estos dos procesos el estado hídrico de la planta. Cuando este equilibrio se pierde, las células y tejidos se deshidratan incrementando su temperatura (Henckel 1964), iniciándose una serie de ajustes como: cierre estomático, disminución de los procesos fotosintético y transpiratorio, (Bennet et al. 1987); suspensión de la división celular y reducción del alargamiento (Brevedan y Hogdes 1973); alteración de los procesos hormonales y como consecuencia, la reducción del crecimiento (Larque 1977).

5.6.2 Afectaciones en el Rendimiento del Arroz Sometido a Sequía

El sometimiento de la planta de arroz a estrés hídrico reduce substancialmente el crecimiento: el área foliar e Índice de área foliar caen hasta en un 60%, lo que trae consigo un decremento en la captación de la radiación solar disminuyendo la fotosíntesis y producción de materia seca; reducción en el crecimiento y desarrollo del sistema radical y por tanto se disminuye el suministro de nutrientes a la planta, debido a que estas no pueden absorber adecuadamente los iones, incidiendo negativamente sobre el rendimiento agrícola del grano. (Da Silva y Guimaraez 1990).

En caso de que el déficit de agua se produzca durante corto tiempo en la fase de división celular o de maduración, provoca un pequeño retraso pero significativo en la acumulación del peso seco de los granos pues en esta etapa es donde la planta necesita la mayor cantidad de agua libre para propiciar el llenado de los granos. Si la sequía se produce durante la fase vegetativa y después se suprime, la producción de materia seca total puede ser superior en la etapa reproductiva a la variante de riego durante todo el ciclo, por la alta emisión de hijuelos tardíos, sin embargo no se beneficia en igual proporción la producción de granos (Gajri y Prihar 1983, Lowlar et al. 1981).

Información reportada por Bashor et al. (1991), indica que el área de la hoja bandera es quien guarda la mayor relación con el rendimiento agrícola en el arroz, de forma directa o indirecta, pues está asociada al número de granos llenos por panículas y la longitud de ésta. El tamaño de la panícula y el número de granos se definen durante la etapa vegetativa; sin embargo en condiciones de estrés los órganos de la planta alcanzan la senescencia más rápidamente con efectos nocivos para la formación de los granos, a causa una reducción en la fotosíntesis en la etapa más activa de desarrollo de la planta, provocando una disminución significativa en la formación de fotosintatos y los carbohidratos necesarios para la formación y llenado de los granos (Yoshida 1982, Yamagata 1997). Algunos autores han considerado que la translocación de sustancias de reserva es lo más importante en el llenado de los granos de arroz y funciona como mecanismo de tolerancia a la sequía. Sin embargo De Rayssae (1988), reporta que el mecanismo clave en ese sentido no es la translocación de las sustancias de reserva al grano, sino la acumulación eficiente de carbohidratos durante la fase vegetativa.

Los principales aspectos en que se ve afectado el arroz en estrés por sequía son:

Elongación Foliar. La velocidad de elongación de la hoja se reduce cuando la planta se encuentra en condiciones de tensión de humedad, pudiendo alcanzar una reducción hasta de un 94% cuando la humedad del suelo posee un valor inferior al 19%, durante un período de 16 días (IRRI 1983). Esta reducción en el crecimiento es una consecuencia de la disminución en la turgencia de las hojas debido a la pérdida de agua causada por el estrés, lo cual está asociado a una menor asimilación de carbono (Osombi 1984).

Altura de la Planta. La altura final de las plantas en condiciones de temporal experimenta una reducción que estará en dependencia de la respuesta varietal, así como de la tensión de humedad a que estuvieron sometidas. En arroz según lo reportado por Chida (1993), la producción de materia seca por día es baja en los estadios tempranos de crecimiento y la mayor producción se alcanza en el máximo ahijamiento, después del cual decrece.

Fotosíntesis y Productividad. Alfonso (1986) y Ramírez et al. (1991), reportan que al someter las plantas de arroz a estrés hídrico durante el desarrollo del cultivo se redujo significativamente la altura de la planta y la producción de materia seca, lo que provocó la disminución en el rendimiento agrícola y su cuantía depende de la variedad y fenofase en que se produce el estrés. En trabajos realizados por Mathews y Boyer (1984), informan que al disminuir el contenido de agua en la planta, se reduce la fotosíntesis y la producción de fotosintatos, afectando el desarrollo de la planta; a lo que agregan Yoshida et al. (1981) e IRRI (1986), que este déficit de agua provoca una reducción en la altura de las plantas que se acentúa con la duración del estrés y varía con la etapa de crecimiento; y es más afectada si la variedad ha sido seleccionada sólo para condiciones de riego. Al respecto Muchow et al.

(1986) y Talukder (1987), encontraron en arroz un efecto negativo sobre el índice de área foliar, con independencia de la tolerancia a la sequía que tengan las variedades; carácter este muy asociado con el rendimiento agrícola en el arroz (Da Silva et al. 1985).

Desarrollo Radicular. El crecimiento de la raíz y por consiguiente el de la planta está sujeto a: edad de la planta, contenido de oxígeno, humedad del suelo, temperatura, disponibilidad de nutrientes, presión osmótica de la solución del suelo, niveles tóxicos de elementos, presencia de patógenos, genotipos y métodos de cultivo (Fageria 1984). Al respecto Kasperbaner y Busscher (1991) en algodón y Masle (1992) en trigo y cebada encontraron variabilidad genética en la habilidad de penetración favorable a raíces gruesas. En tal sentido IRRI (1993), informa que el grosor de la raíz tuvo un efecto directo sobre la resistencia a la sequía mientras que para el largo fue negativo. Nguyen et al. (1994) reportan al respecto que la habilidad de penetración se correlacionó positivamente con el grosor de la raíz.

En resumen cuando las plantas se someten a estrés de humedad, se reduce la altura, área foliar y rendimiento (Kramer 1983); a causa de la inhibición del alargamiento celular, lo que está dado por el grado de turgencia que tienen las células en estas condiciones (Boyer 1968), así como la alteración en los procesos fisiológicos tales como: fotosíntesis, respiración, translocación y distribución de metabolitos (Eastin 1983). Los mecanismos que la planta de arroz posee para conservar el agua e incrementar la tolerancia a la sequía incluyen el enrollamiento de la hoja y cierre de los estomas (Ingram et al. 1994); tienen un efecto negativo sobre el crecimiento, área foliar, índice de área foliar y producción de materia seca, provocando reducción en el rendimiento agrícola e industrial.

5.7 Resistencia a Sequía

La sequía en términos genéricos puede definirse como una deficiencia de agua que depende de dos factores: variaciones en el descenso del potencial hídrico en el ambiente y variaciones en el tiempo o duración de estos descensos.

La resistencia a sequía es un fenómeno complejo que resulta de las características histológicas y fisiológicas con factores ambientales. De acuerdo con ello se han usado diferentes términos para describir la respuesta de las plantas a tensiones de humedad, resultante de las interacciones de diversos mecanismos a los que se han asociado algunos caracteres morfológicos, fisiológicos y las variaciones en la demanda de agua propias de la especie (Morgan 1989) y la afectación que experimenten algunas de ellas repercutirá en la producción de granos. La magnitud del efecto depende de la intensidad, duración y respuesta de la variedad a la sequía destacándose las de ciclo corto por una mayor eficiencia en el uso del agua según informan Armenta (1981), Távitás (1981), Gupta y O'Toole (1986), asociando la resistencia a cuatro mecanismos: escape, evitación, tolerancia y recuperación que a continuación se definen:

5.7.1 Escape

Capacidad fisiológica de la planta para escapar al efecto de la sequía, completando su ciclo vegetativo antes de que se presente el estrés de humedad.

5.7.2 Evitación

Propiedad genético-fisiológica de la planta para evitar los efectos de la sequía por dos vías importantes, una vía es por el mantenimiento del nivel de hidratación de los tejidos a causa del desarrollo de sus raíces profundas y reducción del flujo de agua de los tejidos, tallos y hojas. Por otra parte por la disminución de la pérdida de agua a través del rápido cierre de los estomas y enrollamiento de sus hojas, lo que disminuye la superficie evaporativa ayudado por la plasticidad y serosidad de las cutículas de las mismas.

5.7.3 Tolerancia

Habilidad del citoplasma de las células para sobrevivir y funcionar normalmente aunque los tejidos de la planta se des sequen o tengan potenciales de agua reducidos, a fin de poder soportar el déficit de presión y difusión de la misma. Es la resultante de interacciones fisiológicas complejas que involucran procesos de osmorregulación.

5.7.4 Recuperación

Consiste en la habilidad genético-fisiológica de las plantas para reanudar su desarrollo fenológico después de un período de carencia de humedad del suelo; la velocidad con que se presenta está asociada al mayor contenido de agua o potencial hídrico, (Bhattachargee et al. 1971), es decir la velocidad de recuperación es proporcional al potencial de agua en las vainas y las hojas; y esta recuperación puede registrarse en cualquiera de las etapas fenológicas (Chang et al. 1983).

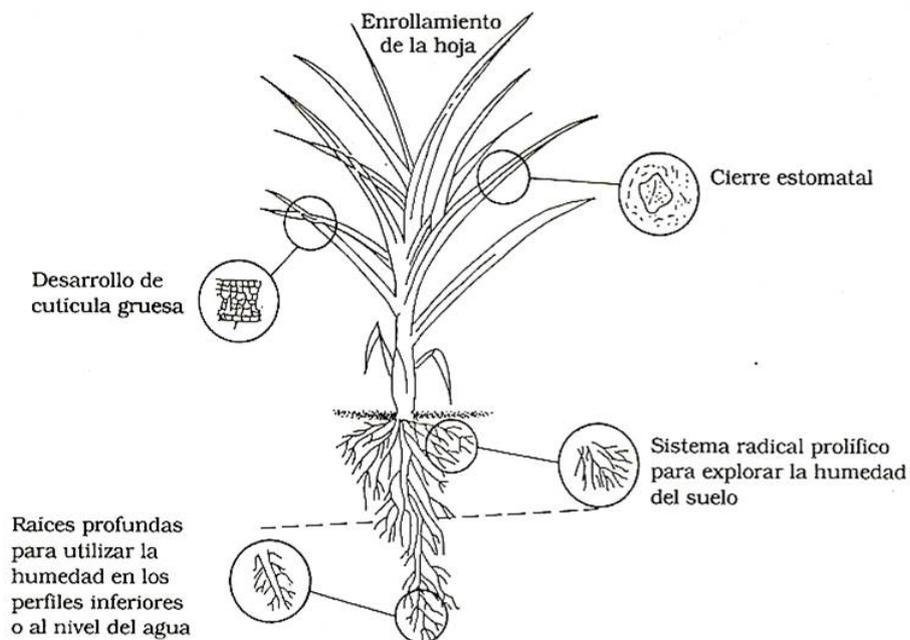


FIGURA 2. Mecanismos evasión y tolerancia a sequía en Arroz (O'Toole y Chang 1978)

La resistencia a la sequía es conferida a las plantas por alguno o por la combinación de estos cuatro mecanismos. Cada uno de ellos incluye varios caracteres que pueden ser utilizados por los fitomejoradores (Arrandeanu 1989) debido a que la naturaleza de la resistencia a la sequía es fisiológica y genética. La magnitud del efecto de sequía depende de la resistencia propia de la variedad, características genéticas y rasgos agronómicos específicos, intensidad y duración del estrés y la etapa de desarrollo en que se encuentre la planta durante la carencia de agua (Singh et al. 1986, Morgan 1989).

A nivel biológico y considerando el contenido de agua en los tejidos de las plantas durante los períodos de sequía, se han propuesto diversos indicadores agronómicos para identificar los genotipos que manifiestan tolerancia a sequía tales como: enrollamiento de las hojas y cierre de los estomas; ajuste osmótico y habilidad del sistema radical para absorber agua de los perfiles profundos del suelo. A nivel celular se ha planteado sobre la aptitud de algunas especies para concentrar mayor cantidad de ácido abscísico, que se forma en los cloroplastos, el cual influye favorablemente en la resistencia a la sequía (Chang y Loresto 1986, Hernández y Távitás 1991, Jensen et al. 1989, Távitás 1986, Mc Williams 1989). Estos indicadores y otros como el crecimiento de la planta, duración del ciclo e índice de área foliar; pueden emplearse en los programas de mejoramiento de arroz de secano.

5.8 Biotecnología Aplicada al Mejoramiento Genético del Arroz

El rendimiento mundial del arroz para 1996 fue de 2.52 Tm/ha, y se proyecta que para el año 2010 el rendimiento será de 2.87 Tm/ha, un incremento anual de 0.93%. Incremento un poco optimista si consideramos que el incremento en los últimos 6 años fue de 0.68%, la base para ese rendimiento "optimista" proyectado responde básicamente al desarrollo e incremento en el uso de variedades mejoradas (IRRI 1993). Sin embargo la reducción del rendimiento causado por el estrés ambiental continúa siendo uno de los problemas más comunes y complejos a resolver por el mejoramiento genético en el arroz (Sano 1997).

En los países asiáticos el arroz se produce en áreas de cultivo donde predomina la práctica de inundación del terreno durante prácticamente todo el ciclo del cultivo. En México, la escasa disponibilidad de agua no permite manejar el agua de esa manera, por lo que los estudios sobre riego en el arroz se enfocan a reducir la lámina de agua utilizada. En México, las inversiones para desarrollar cultivos de arroz con producciones sustentables obligan a establecer la obtención de semilla por medios biotecnológicos, y ya que el 65% de su producción proviene de riego, es primordial la generación de plantas tolerantes estrés por sequía que permita la optimización de riegos, una buena producción en zonas de temporal en zonas ya establecidas o que permita su adaptación en zonas con potencial para este cultivo.

El sistema de mejoramiento tradicional de cultivos involucra un largo periodo de selección y cultivo de las plantas portadoras de los caracteres agronómicos deseados. En el caso de la manipulación de caracteres sencillos como la resistencia a enfermedades o insectos, existen alternativas biotecnológicas para incrementar la eficiencia del mejoramiento tradicional como el aislamiento y uso de QTL's (Quantitative Trait Loci)-(Young 1996). El mejoramiento tradicional ha sido lento en el caso de la tolerancia a sequía y alto rendimiento por ejemplo, debido a su complejidad.

El arroz como cultivo de gran importancia económica y alimenticia, representa una necesidad de desarrollar nuevas variedades con mejor tolerancia a estrés abiótico. En arroz no se han asociado características fenotípicas directas con la tolerancia a sequía, sin embargo se han estudiado algunas características relacionadas como el desarrollo de un sistema radicular profundo (Ekanayake et al. 1985; Lilley y Fukai 1994; Wade et al. 1996) y ajuste osmótico (Ludlow y Muchow 1990; Zhang et al. 1999). A pesar de estos avances, la selección de arroces tolerantes a estrés abiótico no tiene bases genéticas conocidas lo que hace más difícil el fitomejoramiento para esta característica.

5.8.1 Mejoramiento Genético de la Resistencia a Sequía en Arroz.

El estrés de sequía en el arroz, afecta prácticamente todos los caracteres del crecimiento y desarrollo de la planta, modificando la anatomía, morfología, fisiología y bioquímica (Datta y Sechu 1982). La tolerancia a estrés abiótico es una característica compleja y la producción de plantas adaptadas a este tipo de estrés involucra cambios genéticos y modificaciones fisiológicas importantes (Nguyen et al. 1997). Diversos investigadores han manifestado que combinar el carácter resistencia a la sequía y alto potencial de rendimiento en el arroz es muy difícil ya que esta especie es altamente exigente en agua y que genéticamente este carácter está asociado en la mayoría de los casos a caracteres agronómicos indeseables y una mayor rusticidad de la planta (Távitas 1987).

Las estrategias actuales para el mejoramiento de cultivos mediante ingeniería genética, en general se enfocan en la transferencia de uno o varios genes que se encuentren involucrados ya sea en vías de señalización y regulación, genes que codifican enzimas presentes en vías que dirigen la síntesis de protectores funcionales o estructurales como los osmolitos y antioxidantes, o proteínas que confieren tolerancia al estrés.

5.8.1.1 Factores de Transcripción

Una vía importante en conferir tolerancia a múltiples tipos de estrés es la sobre-expresión de factores de transcripción que controlan el funcionamiento de varios genes (Kasuga et al. 1999, Kim et al. 2004, Oh et al. 2005). Es generalmente aceptado que la activación de factores de transcripción específicos afecta la expresión de un grupo de genes funcionales relacionados entre sí. Siguiendo este concepto, han sido reportados diversos trabajos en los que con el fin de aumentar la resistencia al estrés en arroz se han sobreexpresado distintos factores de transcripción de respuesta a estrés como HRD (Karaba et al. 2007), ZFP252 (Xu et al. 2008) y genes de la familia SNAC (Hu et al. 2006, Nakashima et al. 2007; Hu et al. 2008).

Los factores de transcripción NAC comprenden una gran familia de genes cuyas proteínas contienen a dominio N-terminal de unión a DNA altamente conservado. La caracterización en arroz determinó que este gen es inducido específicamente en células guarda bajo condiciones de estrés por sequía. La sobreexpresión de genes de esta familia en arroz ha incrementado la tolerancia a sequía (Hu et al. 2006; Nakashima et al. 2007; Hu et al. 2008) en arroces de la subespecie *Japónica*, así mismos se ha comprobado la inducción de expresión de genes de defensa a estrés en respuesta a la expresión de los genes SNAC por lo que son propuestos como de utilidad en el aumento de tolerancia a sequía en arroz.

5.8.1.2 Proteínas Reguladoras

Otro enfoque en la búsqueda de conferir tolerancia a estrés es a través de la sobreexpresión de genes involucrados en la recepción y transducción de señales de estrés abiótico (Shou et al. 2004; Saijo et al. 2000). La investigación entorno a familias de genes que sean inducidos por señales de estrés en arroz buscan aumentar por esta vía la tolerancia a estrés; los genes incluyen proteínas que interactúan con cinasas (Xiang et al. 2007), proteínas LEA (Xiao et al. 2007) y proteínas asociadas a estrés (SAP) (Kanneganti y Gupta 2008). Así como genes que expresan moléculas de protección como inhibidores de proteínasas (Huang et al. 2007) y proteínas de choque térmico (Sato y Yokoya 2008). Se observa en común que existen mayor la tolerancia al estrés, en algunos casos para un tipo específico, y que existe inducción de genes de respuesta a estrés abiótico así como la acumulación de sustancia osmoreguladoras.

5.8.1.3 Sustancias Osmoreguladoras

Los principales tipos de estrés abiótico como frío, salinidad y sequía, finalmente desencadenan en la plantas estrés osmótico lo que ocasiona cambios a nivel celular y molecular como la acumulación de solutos orgánicos u osmolitos. Por ejemplo arroz estresado por alta salinidad acumula poliaminas (Krishnamurti y Bhagwat 1989) y prolina (Alia y Saradhi 1993, Chou et al. 1991), otras plantas acumulan comúnmente azúcares (Price et al. 2004), polioles (Alexander et al. 1994, Loescher et al. 1992) y como se ha visto, en casos menos comunes trealosa (Anselmino y Glig 1993, Drennan et al. 1993; Goddijn y van Dunn 1999).

De las sustancias osmoreguladoras conocidas, la trealosa representa un molécula interesante debido a sus funciones en la osmoprotección y tolerancia a la disecación (Anselmino y Gligo 1913, Drennan et al. 1993, Goddijn y van Dun 1999). La acumulación de prolina como sustancia protectora de respuesta a estrés en arroz de forma común ha llevado a la investigación en la acumulación de prolina (Jin y Ray 2004) con un incremento de tolerancia, sin embargo es sabido que la trealosa tiene mayor capacidad de protección que la prolina en arroz sometido a estrés salino (García et al. 1997). Ha sido demostrado que la trealosa estabiliza proteínas y lípidos de membrana manteniendo la fluidez de membrana bajo condiciones de sequía (Leslie et al. 1995) por lo que en arroz así como en otras plantas se ha evaluado si la sobreproducción de este azúcar conduce al incremento de tolerancia a sequía y otros tipo de estrés.

Con el antecedente de trabajos realizados en tabaco para la acumulación de trealosa (Holmstrom et al. 1996, Pilon-Smits et al. 1998, Yeo et al. 2000), la sobreexpresión regulada de genes biosintéticos de trealosa (*otsA* y *otsB*) de *E. coli* en arroz para manipular la tolerancia al estrés fue reportada por Garg et al. (2002) donde se observó una correlación entre la acumulación de trealosa y niveles altos de carbohidratos solubles así como una elevada capacidad de fotosíntesis en condiciones normales y de estrés de baja temperatura, salinidad y sequía.

Tabla 1. Plantas Transgénicas de Arroz para Incrementar la Resistencia a Sequía

Gen	Origen	Observaciones	Referencia
FACTORES DE TRANSCRIPCION			
<i>HRD</i>	<i>Arabidopsis</i>	-Plantas de bajo consumo de agua -Mayor biomasa bajo condiciones de riego -Incremento de biomasa de raíz en condiciones de estrés por sequía	Karaba et al. 2007
<i>SNAC1</i>	Arroz	-Aumento germinación en condiciones de estrés -Aumento del rendimiento en condiciones de sequía en etapa reproductiva. -Aumento de resistencia a sequía y tolerancia a la sal en estado vegetativo. -Mayor sensibilidad a ABA y pérdida de agua más lentamente.	Hu et al. 2006
<i>SNAC6</i>	Arroz	-Aumento en la tolerancia a deshidratación y estrés salino. -Retardo en el crecimiento y bajo rendimiento en etapa reproductiva.	Nakashima et al. 2007
<i>ZFP252</i>	Arroz	-Incremento de prolina libre y azúcares solubles, -Inducción de expresión de genes de defensa a estrés.	Xu et al. 2008
<i>SNAC2</i>	Arroz	-Aumento de tolerancia a estrés salinos y sequía -50% de sobrevivencia después de exposición a baja temperatura. -Alto porcentaje de germinación -Mayor tasa de crecimiento en condiciones de alta salinidad. -Aumento de tolerancia a tratamiento de PEG,	Hu et al. 2008
<i>HvCBF4</i>	Cebada	-Incremento en sensibilidad a ABA -Incremento de la tolerancia a sequía, alta salinidad y baja temperatura. -Ligero aumento incremento en la capacidad fotosintética en condiciones de baja temperatura	Oh et al. 2007
PROTEINAS REGULADORAS			
<i>LEA3-1</i>	Arroz	-Alto rendimiento de grano en condiciones de estrés	Xiao et al. 2007
<i>SAP8</i>	Arroz	-Tolerancia a la sal, sequía y estrés por frio en la etapa de germinación y plántula -Alto porcentaje de germinación y recuperación de peso fresco -Tolerantes a la sal y sequía durante el estado de antesis -Disminución del 50% en rendimiento.	Kanneganti y Gupta 2008
<i>sHSP17.7</i>	Arroz	-Alta capacidad de recuperación y crecimiento después de un periodo de sequía.	Sato y Yokoya 2008
<i>CPII</i>	Arroz	-Mayor rendimiento de grano bajo condiciones de sequía severa. -Menor pérdida de proteínas totales en condiciones de estrés por sequía.	Huang et al. 2007
<i>CIPK03</i> <i>CIPK12</i> <i>CIPK15</i>	Arroz	-Mayor tolerancia al frio (CIPK03), sequía (CIPK12) y estrés salino (CIPK15) -Incremento en acumulación de prolina y azúcares solubles.	Xiang et al. 2007
<i>COIN</i>	Arroz	-Mayor tolerancia al frio, salinidad y sequía. -Incremento de niveles de prolina	Liu et al. 2007

Tabla 1.Cont...			
Gen	Origen	Observaciones	Referencia
SUSTANCIAS OSMOREGULADORAS			
<i>otsA/otsB</i>	<i>E. coli</i>	-Niveles altos de carbohidratos solubles -Elevación de capacidad fotosintética bajo condiciones control y estrés.	Garg et al. 2002
<i>otsA/otsB</i>	<i>E. coli</i>	-Incremento en tolerancia a sequía, salinidad y frío	Jang et al 2003
<i>TPP1</i>	Arroz	-Aumento de tolerancia a estrés salino y frío.	Ge et al. 2008
<i>adc</i>	<i>Datura stramonium</i>	-Protección al tratamiento de sequía.	Capell et al. 2004
<i>p5cs</i>	Frijol	-Alta tolerancia a estrés salino o déficit de agua. -Rápido crecimiento de hojas y tallo en plántulas -Incremento en biomasa bajo condiciones de sequía.	Su y Wu 2004

5.8.2 Transformación Genética de Arroz

La transformación es una técnica biotecnológica por la cual genes funcionales son insertados en el genoma de interés por medio de diversos sistemas de entrega. La transformación genética de plantas consiste de la entrega, integración y expresión de genes foráneos en la célula vegetal que finalmente regenerara a una planta completa. Desde hace tiempo se han realizado constantes esfuerzos en mejorar características agronómicas relevantes en el rendimiento del arroz a través de técnicas biotecnológicas y la transformación es una importante herramienta para el mejoramiento genético, como también es esencial un buen sistema de cultivo *in vitro*.

Es generalmente aceptado que el genotipo es el principal factor limitante en la transformación exitosa de arroces de la subespecie *Indica*, debido a que existen variaciones significativas en la respuesta a cultivo de tejidos *in vitro* entre los distintos germoplasmas (Ge et al. 2005). En general los arroces de la subespecie *Indica* presentan una baja respuesta a la inducción y proliferación de callo embriogénico junto con el difícil mantenimiento del potencial embriogénico y la capacidad de regeneración de plántulas verdes.

Los estudios realizados para clarificar las bases genéticas de la respuesta de cultivo de tejidos en Gramíneas han revelado que existe un complicado mecanismo de regulación genética controlado probablemente por grupos distintos de genes que regulan la respuesta del cultivo *in vitro*. En sorgo Ma et al. (1987) encontró que la habilidad de formar callos con capacidad regenerativa variaba entre los distintos genotipos y fue de carácter hereditario actuando como carácter dominado por dos genes o grupo de genes. Sin embargo la extensa variabilidad de la respuesta al cultivo *in vitro* sugiere mas bien que todos las variedades tienen la capacidad genética y las diferencias genéticas se encuentran en los diferentes niveles de reguladores presentes en el explante los cuales, en combinación con los reguladores presentes en el medio de cultivo desarrollarán una respuesta específica (Bhaskaran y Smith 1990).

La transformación genética de arroz comenzó con métodos de transferencia directa de genes en la subespecie *Japónica* a través de transformación de protoplastos (Toriyama et al. 1988, Zhang et al. 1988). Posteriormente se reportó la recuperación de las primeras plantas

transgénicas de arroz de la subespecie *Indica* de la variedad Chinsurah Boro II utilizando también el sistema de protoplastos (Datta et al 1990). La variedad Taipei 309 fue usada inicialmente como modelo de transformación de arroz, seguido por Nipponbare, Yamabiko, Yamabiko, Noria 14, Zhonghua 6, IRRI-New Plant Type, todos de la subespecie *Japónica* (Ignacimuthu et al. 2000). Como la subespecie *Indica* es más difícil de transformar, el número de variedades transformadas es más limitado.

A pesar de las significantes variaciones en la respuesta adecuada al cultivo *in vitro* y la variabilidad de los genotipos en entre arroces de la subespecie *Indica*, se han reportado trabajos donde se utilizan una variedad de métodos de transformación (Datta et al 1990), sin embargo los mejores y más repetitivos resultados han sido obtenidos utilizando los métodos de protoplastos, biobalística y *Agrobacterium* de buena eficiencia pero limitados a ciertas variedades de la subespecie *Indica* (Datta et al. 2001, Lin y Zhang 2005), lo que confirma la dificultad de transformación en estas variedades. A continuación se mencionaran los principales sistemas de transformación y su utilización en arroz.

5.8.2.1 Sistema de Protoplastos

El sistema de protoplastos consiste en la preparación de un cultivo de células vegetales que han sido aisladas y desprovistas de la pared celular. La obtención de este cultivo puede ser por medios mecánicos (cortando o rompiendo la pared celular), por la digestión de la pared celular por medios enzimáticos (pectinasas, celulasas, hemicelulasas o mezcla de ellas). El primer reporte de regeneración a partir de protoplastos para especies de Gramíneas (Vasil y Vasil 1980) abrió nuevas posibilidades de transformación genética en cereales y pastos.

Transformación mediada por PEG. Los protoplastos se mantienen en un medio de cultivo y se adiciona el gen a transferir, el PEG produce poros en la membrana plasmática por donde penetra el DNA. En 1986 Uchimiya et al. obtuvo por primera vez callo transgénico con resistencia a kanamicina de protoplastos derivados de raíz de la subespecie *Japónica*. Las primeras plantas transgénicas de arroz con esta técnica fueron reportadas por Zhag et al (1988); posteriormente, se publicó el primer reporte de arroz transgénico de tipo *Indica* variedad Chinsurah II por este método (Datta et al. 2000).

Transformación mediada por Electroporación. Esta técnica utiliza descargas eléctricas para abrir canales en la membrana celular en forma transitoria e introducir el DNA de interés. Toriyama et al. 1998, fue el primero en la producción de arroz transgénico de la subespecie *Japónica* por electroporación de protoplastos aislados de un cultivo de anteras, confiriéndole resistencia a antibióticos. Xu y Li (1994) obtuvieron plantas transgénicas fértiles de arroz tipo *Indica* utilizando embriones maduros.

5.8.2.2 Sistema de *Agrobacterium*

Este método se basa en el mecanismo natural de infección de la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens* que introduce un gen de su plásmido en las células de la planta infectada. El método de transformación mediada por *Agrobacterium* anteriormente limitado a especies dicotiledóneas, fue reportado para arroz por Raineri et al. (1990) en la subespecie *Japónica* por el co-cultivo de embriones maduros pero sin obtener regeneración. En 1994, Hei et al. reporta la regeneración de plantas de arroz de la subespecie *Japónica*, posteriormente se logró la transformación de variedades de la subespecie *Indica* (Rashid et al. 1996, Aldemita y

Hodges 1996) pero con una baja eficiencia y limitado a contadas variedades. Posteriormente Lin y Zhang (2005) dan a conocer un método de transformación de arroz tipo *Indica* con alta eficiencia mediado por *Agrobacterium*.

5.8.2.3 Sistema de Biobalística

El bombardeo con microproyectiles consiste de la introducción en células vegetales de partículas metálicas cubiertas con DNA aceleradas a altas velocidades. Plantas completas pueden ser obtenidas de las células transformadas después de un proceso de selección y regeneración; el proceso de transformación es genotipo independiente por lo que no hay limitación biológica para la entrega del DNA. El método de transformación por biobalística permite obtener de manera eficiente plantas transgénicas de arroz independientemente del genotipo del que se trate.

El primer reporte de un método basado en el bombardeo con microproyectiles en arroz se dio a conocer por Christou et al. (1991) mediante el bombardeo de embriones inmaduros; Sivamani et al. (1996) reporto un método de transformación de callo embriogénico de arroz de la subespecie *Indica* obtenido de un cultivo en suspensión. Modificaciones hechas al protocolo de transformación de callo embriogénico fueron llevadas a cabo con el fin de reducir el tiempo y contaminación del cultivo mediante la inducción de callo en medio sólido suplementado con auxinas se logró transformar y regenerar plantas fértiles de variedades de todo el mundo (Valdez et al. 1998); recientemente se ha utilizado para obtener plantas transgénicas fértiles de la variedad mexicana Morelos A-92 (Martínez et al. 2003).

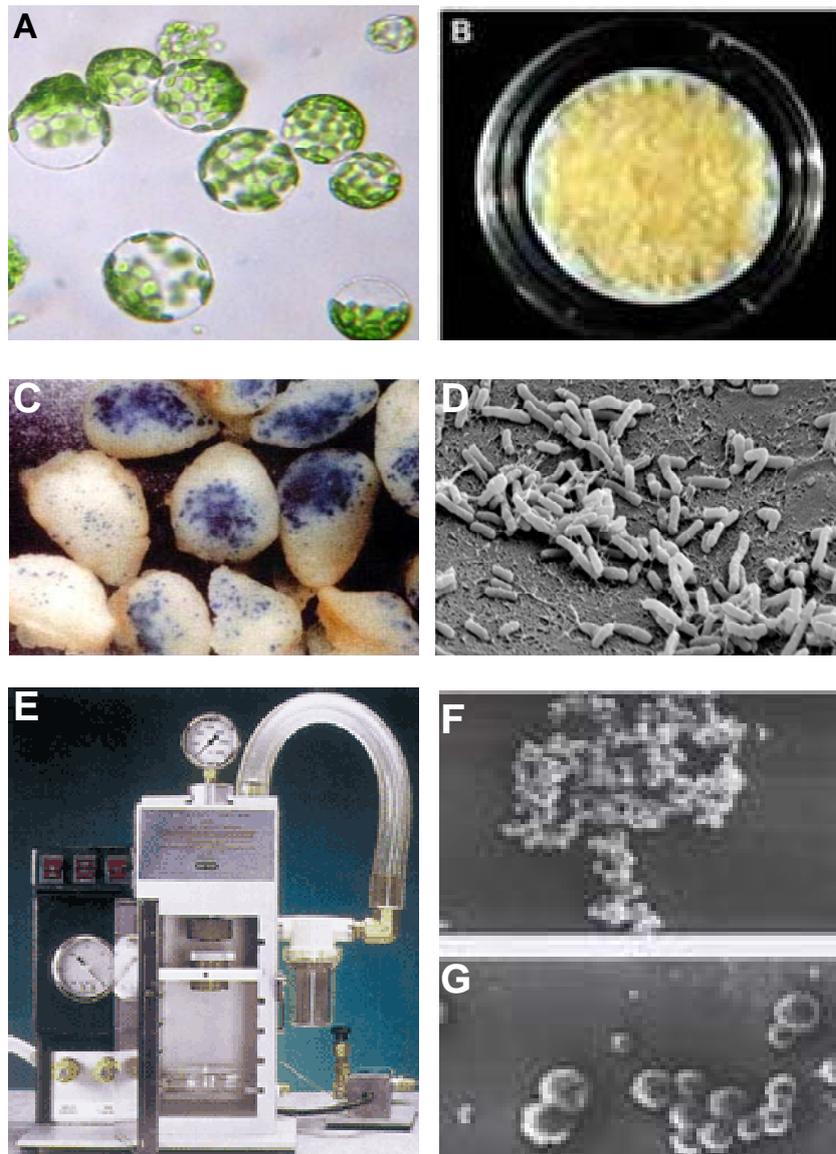


FIGURA 3: Aspectos de los métodos de Transformación Genética de Plantas. A) Protoplastos Vegetales; B) Cultivo de células en suspensión; C) Análisis de gen reportero en embriones inmaduros transformados; D) Micrografía electrónica de barrido de *Agrobacterium*; E) Cámara de transformación por Biobalística; F) Micropartículas de Tungsteno y G) Oro para bombardeo.

5.9 Metabolismo y Señalización de Azúcares en Plantas

La regulación de azúcares en plantas es un proceso complejo y fascinante. Como organismos fotosintéticos las plantas constan de órganos y tejidos fuente exportadores de azúcar y órganos vertedero importadores de azúcar; las señales de azúcar son, entonces generadas de diferentes fuentes y dirigidas a distintas localizaciones. El metabolismo de

azúcares también es un proceso muy dinámico, dado que los flujos metabólicos y las concentraciones de azúcares se alteran dramáticamente durante el desarrollo de la planta y ocurren en respuesta a señales ambientales, como los cambios diurnos, estrés biótico y abiótico (Gupta y Narinder 2005).

Los azúcares regulan actividades de crecimiento en tejidos exportadores e importadores de carbohidratos (órganos fuente y vertedero, respectivamente); esto asegura la síntesis óptima y uso de carbón y fuentes de energía (Stitt y Krappé 1999, Coruzzi y Bush 2001). En general bajo nivel de azúcar induce o aumenta la fotosíntesis para mantener la homeostasis, moviliza y exporta las sustancias de reserva, en tanto que la presencia de azúcar en abundancia promueve el crecimiento y almacenamiento de carbohidratos (Koch 1996) todo esto permite la adaptación del metabolismo de carbón a las cambiantes condiciones ambientales y a la disponibilidad de otros nutrientes.

En general, las actividades de órganos fuente como la fotosíntesis, movilización de nutrientes y exportación son reguladas positivamente bajo condiciones bajas de azúcar, mientras que las actividades de órganos vertedero como el crecimiento y almacenamiento son reguladas positivamente cuando las fuentes de carbón son disponibles de manera abundante (Figura 4). La actividad fotosintética y la demanda de órganos vertederos necesita ser rigurosamente coordinada y esta coordinación involucra tanto regulación metabólica (substrato y alostérico) y mecanismos de señalización de azúcares específicos (Gupta y Kaur, 2005).

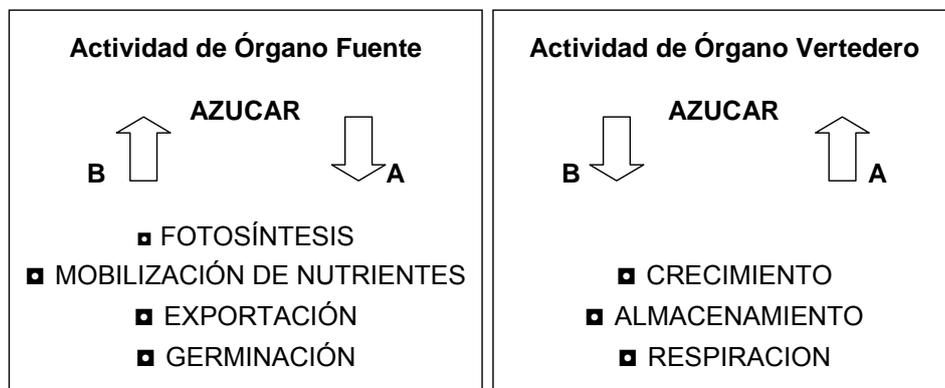


FIGURA 4. Efectos metabólicos de los niveles de azúcar en órganos fuente y vertedero. Efectos diferenciales de actividades fuente y vertedero dependiendo de la disponibilidad de nutrientes (tomado de Gupta y Kaur 2005). ↑, inducción; ↓, represión; A, alto contenido de azúcar; B, bajo contenido de azúcar.

Las características del sistema fuente vertedero son dinámicas y varias de acuerdo a la etapa fenológica del cultivo, genotipo y condiciones agroclimáticas. Uno de los objetivos del mejoramiento genético tradicional ha sido favorecer el balance del carbono hacia el vertedero. Sin embargo en cultivos básicos como el arroz, se ha llegado al parecer a un tope genético que

requiere la implementación de estrategias distintas para incrementar el rendimiento y la eficiencia metabólica del carbono en la fuente y el vertedero (Tofiño 2007).

5.9.1 Sistemas de Monitoreo

Los azúcares producidos durante la fotosíntesis son vitales pues son los substratos de carbón y la energía metabólica que se utilizan en la biosíntesis de polisacáridos como el almidón y celulosa en las plantas. Debido a que la sacarosa es el principal producto fotosintético transportado por el floema, muchos efectos de la señalización por azúcares en el crecimiento y desarrollo pueden ser atribuidos a la acción de productos de su hidrólisis, glucosa y fructosa (así como metabolitos intermedios). Sin embargo, estudios recientes han sugerido que la sacarosa y la trealosa, o la trealosa-6-fosfato (T6P) regulan respuestas específicas en donde no se ven involucradas las hexosas (Smeekens 2000, Gupta y Kaur 2005).

El nivel de azúcares de células vegetales es monitoreado por proteínas sensoras específicas. El monitoreo de azúcares es la interacción entre la molécula de azúcar y la proteína sensora, de esta manera se genera una vía de señalización, la señal entonces inicia una cascada de transducción de señales que resulta en respuestas celulares, tales como la alteración de la expresión genética y ciertas actividades enzimáticas. Los azúcares y las moléculas de señalización, afectan todos los estadios de las plantas influenciando desde la germinación y hasta el desarrollo de las semillas. Los azúcares como hormonas, pueden actuar como mensajeros primarios y regular las señales que controlan la expresión de varios genes involucrados en el metabolismo de azúcares (Gupta y Kaur 2005).

La célula vegetal posee distintos transportadores de azúcares capaces de transportar sacarosa con diferentes afinidades; en algunos tejidos la sacarosa se hidroliza en glucosa y fructosa por una invertasa localizada en la pared celular. El importe de la glucosa hacia el interior de la célula puede realizarse a través de importadores de monosacáridos STP's (Sugar Transporters) (Rolland 2006).

Una vez que la glucosa se encuentra en el interior de la célula a través de la hexocinasa se desarrollan los procesos percepción y señalización mediada por azúcares. Se han propuesto dos sistemas para el monitoreo de hexosas en plantas: uno es la vía dependiente de hexocinasa (HXK) que requiere la fosforilación de azúcares y otra vía independiente de HXK que puede detectar los azúcares como tal (Smeekens 2000). En la vía dependiente de HXK los azúcares que son fosforilados por la HXK son capaces de desencadenar la represión de genes fotosintéticos de manera independiente del metabolismo de la glucosa (Jang y Sheen 1994). En la vía independiente de HXK, los azúcares transportados al interior de la célula sin fosforilar activan la expresión de genes de la invertasa de pared celular (CIN), sacarosa sintasa (SuSy) y fenilalanina amonía liasa (Roitsch et al. 1995; Godt y Roitsch 1997; Ehness et al. 1997).

5.9.2 Mecanismos de Respuesta a Estrés Abiótico

Las señales producidas por muchos tipos de estrés ambientales como la sequía, frío y salinidad son integradas al metabolismo de la plantas y conducen a alteraciones mayores en el metabolismo de carbohidratos (Hare et al. 1998, Thomason et al. 1999, Wagner yJunttila 1999, Kaur et al. 2000) y las vías de señalización de azúcares interactúan con las vías de estrés para modular el metabolismo en respuesta al ambiente. Indirectamente, los azúcares juegan un papel importante durante el crecimiento y el desarrollo de la planta bajo el estrés abiótico por la regulación del metabolismo de carbohidratos.

Los principales mecanismos fisiológicos de respuesta general a estrés están relacionados con respuestas plásticas como modificaciones en la época de senescencia, cambios en el funcionamiento de las células guarda o en el cierre estomático, mantenimiento de la estabilidad de las membranas celulares y de los organelos y cambios en la elasticidad de la pared celular (Chinnusamy et al. 2005).

Se ha observado que la expresión un gran número de genes está asociado con la respuesta común a estrés por glucosa, indicando el papel de los azúcares en la respuesta a estrés abiótico (Price et al. 2004). En *Arabidopsis* se han reportado 31 genes correspondientes a enzimas de metabolismo de carbohidratos regulados por efecto del frío, sequía y estrés salino (Seki et al. 2002). La regulación diferencial del contenido de carbohidratos y enzimas del metabolismo relacionadas (Castrillo 1992, Pelleschi et al. 1997), corroboran el papel de los azúcares como moléculas de señalización en la expresión genética bajo estrés abiótico.

Además de proteínas asociadas con la respuesta a un amplio espectro de factores abióticos, se han identificado proteínas específicas a cada tipo de estrés, como las proteínas anaeróbicas (ANP) que incluyen enzimas de la glicólisis y la fermentación; proteínas del estrés hídrico (WSP), asociadas con las proteínas de los canales de agua y las que forman osmoprotectantes; las proteínas de embriogénesis tardía (LEA), asociadas con la rotación y la translocación de las proteínas como respuesta al estrés osmótico (revisión en Rolland 2006).

La percepción del estrés involucra componentes específicos de los cuales no se sabe mucho, en el proceso de señalización siguiente a la percepción, se amplifica y transduce el estímulo mediante la maquinaria de transducción que está compuesta por proteínas quinasas, fosfatasa y proteínas de ligamiento al Ca^{2+} . También se ha registrado la interacción entre diferentes fitorreguladores intermediarios y otras moléculas de la ruta de señalización, relacionados con la senescencia como etileno, glucosa y ABA, y entre auxinas y ABA en la cascada de proteínas de genes mitóticos activados por quinasas (MAPK). De manera similar, la detención del crecimiento bajo estrés y la reanudación bajo condiciones óptimas se ha asociado con el efecto de la fluctuación del balance hormonal entre ABA, giberelinas y auxinas sobre la estabilidad de las proteínas DELLA (Figura 5) (Bennet et al. 2005).

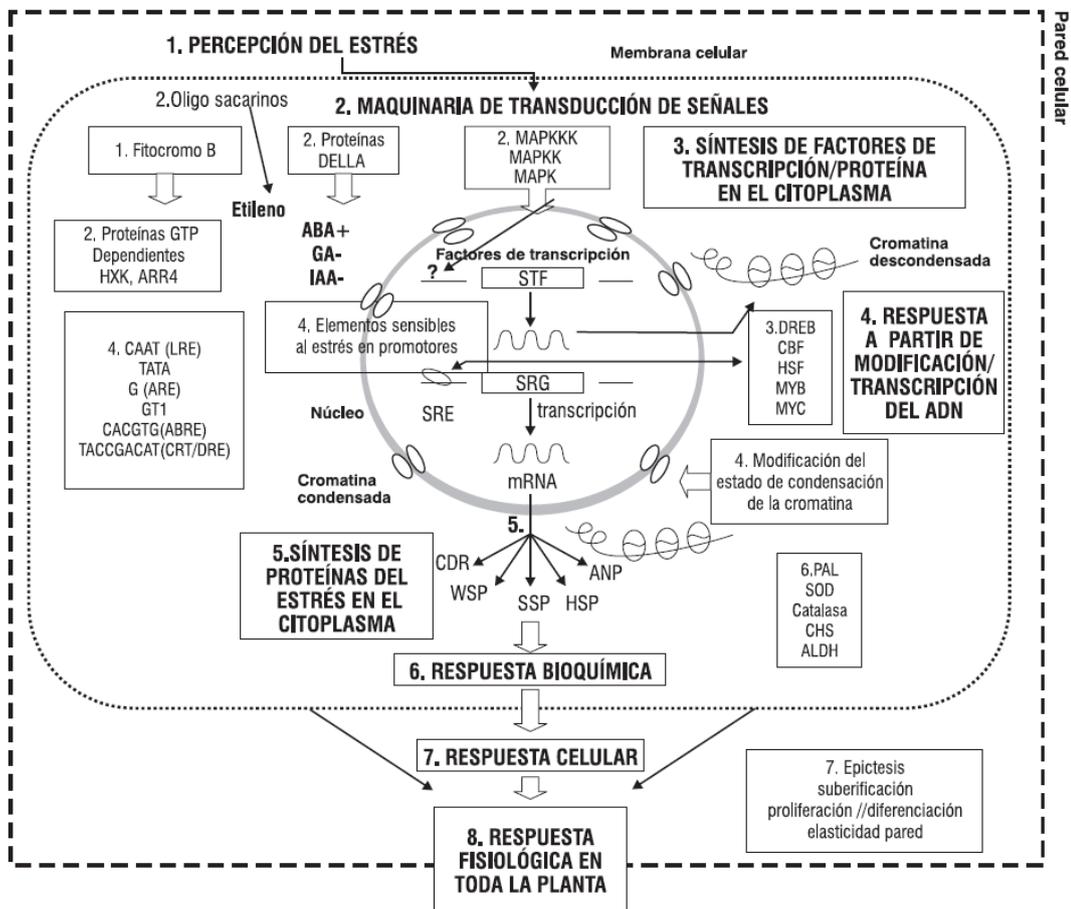


FIGURA 5. Modelo de los procesos celulares de percepción y respuesta al estrés abiótico. La gráfica representa un modelo ajustado a los fundamentos teóricos de las posibles rutas de percepción y transducción de señales del estrés hídrico a nivel celular. Los recuadros en mayúsculas definen tanto el proceso metabólico general y los recuadros numerados son ejemplos alternativos de cada proceso. La secuencia numérica indica la secuencia sugerida de eventos en la ruta de percepción y respuesta. (Modificado de Bennet et al. 2005, Grover et al. 2001, Lamotte et al. 2005, Lu et al. 2005, Rolland et al. 2006). **MAPK**: Proteínas de genes mitóticos activados por quinasas; **HXK**: hexoquinasas; **LRE**: elementos de respuesta a la luz; **DRE**: elementos de respuesta a la sequía; **ABRE**: elementos de respuesta a ABA; **STF**: factores de transcripción del estrés; **SRG**: genes de respuesta al estrés; **SOD**: superóxidodismutasa; **CHS**: chalcona sintetasa; **ALDH**: aldehído dehidrogenasa; **WSP**: Proteínas del estrés hídrico; **HSP**: proteínas del choque térmico; **ANP**: proteínas anaeróbicas; **PAL**: fosfato amonioliasa; **SSP**: proteínas del estrés por sales. (Tomado de Tofiño 2007).

5.9.3 Azúcares en la Tolerancia al Estrés Abiótico

Muchas plantas acumulan componentes orgánicos en respuesta a estrés ambiental que ocasionan deshidratación celular. Es aceptado que el incremento en la osmolaridad de la célula, lo cual resulta de la acumulación de solutos no-tóxicos (denominados compatibles) osmóticamente activos y es acompañado por entrada de agua hacia el interior de la célula o al menos una pérdida reducida de agua de esta manera proporcionando la turgencia necesaria para la expansión celular. Debido a que las estructuras subcelulares necesitan existir en un ambiente acuoso, la tolerancia a la deshidratación también depende de la habilidad de las

células para mantener la integridad de la membrana y con ello prevenir la desnaturalización de las proteínas.

Los osmolitos cumplen con tres características para ser identificados como tales: (i) incremento en la abundancia de la molécula orgánica que provoca disminución del potencial hídrico de la célula respecto al medio ambiente, (ii) propiedades fisicoquímicas caracterizadas *in vitro*, y (iii) función en conferir protección en especies tolerantes a la sequía o en estadios del desarrollo tolerantes a la disecación (Drennan et al. 1993).

Altas concentraciones de muchos pero no de todos los solutos compatibles han sido propuestos con la capacidad de conferir protección contra daño oxidativo por la eliminación de radicales libres además de su papel en el mantenimiento del equilibrio osmótico sin perturbar las interacciones macromolécula-solvente. Los solutos compatibles que pueden ser acumulados varían entre las diferentes especies de plantas y pueden incluir betaínas y compuestos relacionados; polioles y azúcares como manitol, sorbitol y trealosa; y aminoácidos como la prolina. Sin embargo el mecanismo por el cual estos osmolitos proporcionan protección no es comprendido completamente.

5.9.3.1 Fructanos

Los fructanos son moléculas de polifruktosa que son producidas por muchas plantas y bacterias se localizan en las vacuolas de muchas plantas, además estos pueden jugar un papel en la adaptación a estrés osmótico debido a su naturaleza de alta solubilidad, (Gupta y Kaur 2000). El mecanismo molecular que explique como los fructanos protegen contra los distintos tipos de estrés abióticos no es claro. Sin embargo, se ha propuesto que los fructanos podrían proteger la bicapa lipídica del estrés en virtud de la capacidad de los fructanos de interactuar con los fosfolípidos variando el grado de polimerización (Demel et al. 1998). Los fructanos también se insertan en la bicapa y entonces protegen a los lípidos de sufrir la fase de transición (Vereyken et al. 2001). Esto aparece durante el estrés por frío, la fase de transición de lípidos es la responsable de la mayoría de los daños causados por el incremento de la permeabilidad de la membrana. Se ha demostrado que la bicapa de lípidos de vesículas mostraron menos rompimiento una vez que se realizó un tratamiento de congelamiento-secado en presencia de fructanos (Hincha et al. 2000).

5.9.3.2 Oligosacáridos de Rafinosa

La familia de oligosacáridos de rafinosa (RFO) son α -galactósidos derivados de sacarosa. Estos son rafinosa, estaquiosa y verbascosa y forman los componentes de reservas de carbohidratos en semillas. Son los segundos en abundancia después de la sacarosa como carbohidratos solubles. RFOs pueden jugar un papel en la tolerancia a la desecación durante la maduración de la semilla. Su papel en la protección a plantas sometidas a estrés de déficit de agua ha sido repostado por Taji et al. (2002).

5.9.3.3 Azúcares Alcohol

Los estudios del papel de los azúcares alcohol en la tolerancia a estrés salino en especies terrestres son mayormente correlativos. Sus niveles muestran incremento en plantas superiores, por ejemplo manitol en apio (Stoop y Pharr 1994) y glucitol en *Plantago* (Briens y Larher 1983) bajo estrés salino. El manitol es el principal producto fotosintético de muchas algas y plantas superiores y aumenta la tolerancia al estrés por déficit hídrico primariamente a

través de ajuste osmótico (Loescher et al. 1992). El mecanismo de acción involucra la eliminación de radicales libres de oxígeno y/o estabilización de macromoléculas. En tabaco, el manitol protege a la tiredoxina, ferredoxina, glutatión y la fosforibulocinasa de los efectos de los radicales libres (Shen et al. 1997).

5.9.3.4 Prolina

La acumulación de prolina juega un rol altamente protector en plantas que son expuestas a estrés abiótico, confiriendo ajuste osmótico junto con un incremento en los niveles de otros osmolitos. Otras funciones sugeridas de la prolina es la destoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la interacción con residuos hidrofóbicos de las proteínas. La prolina se acumula en el citoplasma sin presentar efectos detrimentales en la actividad de enzimas citosólicas (Yancey et al. 2001). Se han reportado altas concentraciones de prolina celular (hasta el 80% de la reserva de aminoácidos bajo estrés y el 5% en condiciones normales) debido al aumento de la síntesis y la disminución de la degradación en una variedad de condiciones de estrés como alta salinidad y sequía (Delauney y Verma 1993; Bohnert y Jensen 1996).

5.9.3.5 Trealosa

La trealosa es un disacárido no reductor de glucosa es conocido como un metabolito de reserva en levaduras y hongos, también es uno de los azúcares químicamente más estables (Birch 1963; Elbein 1974) y ha demostrado la capacidad de estabilizar proteínas y membranas lipídicas. Las plantas sintetizan trealosa por una vía que es común en muchos organismos, los organismos que sobre producen trealosa son excepcionalmente tolerantes a la disecación, como el genero *Selaginella lepidophylla* (Anselmino y Gligo 1913) y la planta de “resurrección” *Myrothamnus febellifolius* (Drennan et al. 1993). Además de actuar como osmoprotector (Müller et al. 1995), la trealosa y sus metabolitos tienen implicaciones en el control del desarrollo (Chary et al. 2004, Sato-Nagasawa et al. 2006). La biosíntesis de trealosa también aparece unida al metabolismo de carbohidratos de almacenamiento (Wingler et al. 2000) y en la regulación de la fotosíntesis (Pellny et al. 2004).

5.10 Trealosa

La trealosa (α, α trealosa) es un disacárido formado por la unión 1, 1 de dos moléculas de D-glucosa que no es atacado por la α -glucosidasa. La estructura molecular es $C_{12}H_{22}O_{11}$ y con peso molecular de 342.31. La combinación de su estructura y sus propiedades químicas hacen de la trealosa un disacárido muy estable. El enlace glicosídico 1,1 es esencialmente no reductor, asimismo carece de extremos reductores, en general químicamente inerte en sus interacciones con las proteínas, propiedades que convierten a la trealosa en un azúcar altamente resistente a la hidrólisis (Elbein 1974, Colaco y Roser 1995).

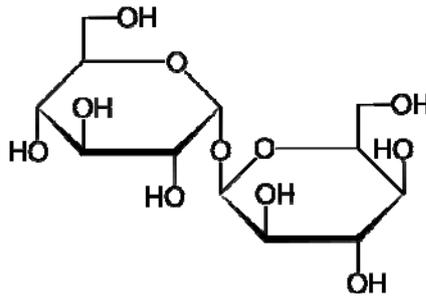


FIGURA 6. Fórmula estructural de la trealosa.

5.10.1 Papel de la trealosa en la Naturaleza.

Las funciones de la trealosa y la trealasa se han estudiado en distintos organismos, y parecen ser especie dependiente. En microorganismos la trealosa es considerada una fuente de energía durante ciertos estadios del desarrollo, como en el inicio de la germinación de esporas (Lingappa y Sussman 1959, Elbein 1974). En micobacterias, la trealosa puede ser incorporada en los glicolípidos y entonces actúa como un componente estructural (Elbein y Mitchell 1973, Elbein 1974). En otros microorganismos, los derivados de trealosa actúan como intermediarios metabólicos o moléculas estructurales (Elbein 1974). La trealosa proporciona la fuente de energía para volar en una variedad de insectos, y probablemente represente una adaptación específica para el vuelo (Wyatt y Kalf 1957, Clegg y Evans 1961, Elbein 1974). En plantas, las especies que producen trealosa son excepcionalmente tolerantes a la desecación, como lo es el género *Selaginella lepidophylla* de plantas vasculares menores (Anselmino y Glig 1913) y la planta de la “resurrección” *Myrothamnus febellifolius* (Drennan et al. 1993). En el caso de *S. lepidophylla*, la acumulación de trealosa bajo condiciones de sequía representa un 15-20% de su peso (Goddijn y van Dunn 1999).

5.10.1.1 Protección contra la Deshidratación

Uno de los más importantes aspectos de la presencia de la trealosa en varios organismos, es su participación en la estabilización de procesos biológicos en especies que pueden sobrevivir ya sea a la deshidratación o el congelamiento. Muchos organismos que sobreviven a ambientes de bajas temperaturas dependen de la presencia de glicerol u otras moléculas que funcionan como anticongelante natural (Elbein 1974, Crowe et al. 1990).

La trealosa además ha mostrado proporcionar protección contra el frío en otros organismos. Ashina y Tanno (1964) descubrieron que la larva de mosca de montaña *Pristiphora geniculata* puede sobrevivir a temperaturas de -40°C conteniendo altas concentraciones de trealosa. En levaduras, la acumulación de trealosa en varias especies está relacionada con la habilidad del organismo de sobrevivir al estrés por calor y desecación (McBride y Ensing 1987; Van Dijch et al. 1995). Plantas como *S. lepidophylla* que contiene cerca de 12.5% de peso seco de trealosa y 1.5% de sacarosa, puede secarse completamente y una vez que es hidratada tiene la capacidad de regresar a su estado habitual (Adams et al. 1990). Embriones de camarón entran en dormancia al acumular trealosa en un 15% de su peso seco. Es considerado que la trealosa actúa como un estabilizador durante la dormancia, y una

fuerza de energía para la emergencia de los embriones después del periodo de dormancia (Clegg 1965). Las concentraciones de trealosa han sido asociadas también con la sobrevivencia de nemátodos durante la desecación, y ha sido sugerido que la presencia de trealosa es un factor de protección durante un choque térmico y estrés osmótico en otros organismos (Womersley y Smith 1981, Newman et al. 1993).

5.10.1.2 Protección contra el Calor

En levaduras la trealosa reduce la formación de agregados de proteínas inducidos por el calor. La trealosa es tan eficiente o más como estabilizador de proteínas que cualquiera de los numerosos solutos compatibles conocidos, incluyendo polioles, azúcares y aminoácidos (DeVirgilio et al. 1994). Los estudios realizados en levadura implican fuertemente a la trealosa en un papel preponderante en la termo-tolerancia además de que son inducidos en respuesta al estrés con el fin de incrementar los niveles de trealosa. Un estudio *in vitro* e *in vivo* mostró que la trealosa protege células del calor por estabilizar proteínas a altas temperaturas. Usando dos diferentes proteínas reporteras con distinta sensibilidad a la temperatura, demostrando que las enzimas son capaces de retener su actividad durante un choque térmico en aquellas células productoras de trealosa (Singer y Lindquist 1998). Este estudio además explica que la trealosa que no es removida del sistema, puede interferir con el proceso de re-naturalización llevada a cabo por chaperonas una vez que ha terminado el periodo de estrés. El efecto de las radicales libres en *S. cerevisiae* es la inducción de acumulación de trealosa lo cual incrementa marcadamente la viabilidad de las células. En este estudio, el manitol y galactosa protegieron también pero en menor proporción que la trealosa, mientras que la sacarosa fue ineficiente (Banaroudj et al. 2001).

5.10.1.3 Protección contra el Frío

Kandror et al. (2002) especulan que existen diferentes proteínas que se desnaturalizan y precipitan en el frío donde los efectos hidrofóbicos son relativamente débiles, mencionando que es posible que la trealosa además prevenga la desnaturalización y agregación de proteínas específicas a temperaturas frías.

5.10.1.4 Estabilización de Membranas Celulares

En micobacterias y corinebacterias, la trealosa es un componente básico de un gran número de glicolípidos de la pared celular (Lederer 1976). El mejor caso conocido y más ampliamente estudiado es de lípidos unidos a trealosa, los lípidos de la pared celular de *M. tuberculosis* contienen un ácido mirístico al cual está unido trealosa mediante un grupo hidroxilo de cada molécula de glucosa. Este lípido es considerado como uno de los principales componentes tóxicos de la pared celular y también altamente responsable de su baja permeabilidad, lo cual confiere considerable resistencia a antibióticos (Brennan y Nikaido 1995). La trealosa también puede estabilizar membranas celulares cuya fluidez decrece cuando la temperatura disminuye. La trealosa exógena ha mostrado que protege a una variedad de organismos contra el congelamiento, con la máxima protección cuando la trealosa se encuentra a ambos lados de la membrana. Los mecanismos de interacción con proteínas de membrana son discutidos a continuación.

5.10.1.5 Regulador Metabólico y/o Molécula de Señalización

Evidencia reciente ha establecido que el paso inicial para la síntesis de trealosa es esencial para el desarrollo embrionario en *Arabidopsis* (Eastmond et al. 2002). El nivel de este

precursor, T6P, determina la capacidad de utilización de carbohidratos con efectos observables en los hábitos de crecimiento y desarrollo de *Arabidopsis* (Schluepmann et al. 2003). Asimismo también determinan los niveles de acumulación de intermediarios respiratorios, apoyando la idea que metabolitos de trealosa afecta la capacidad fotosintética de la planta (Schluepmann et al. 2003). Las funciones regulatorias en procesos metabólicos que redireccionan la localización y utilización de carbohidratos, ubican al metabolismo de la trealosa como regulador metabólico además de sus implicaciones en la protección contra estrés. Adicionalmente, se han descubierto las implicaciones en procesos de división celular a través de la biosíntesis de pared celular, y relacionado con el desarrollo de embriones en *Arabidopsis* (Gómez et al. 2006). Poco es conocido sobre la integración de señales del nivel nutricional (metabolismo de carbón) con señales del crecimiento y desarrollo de células vegetales, por lo que el metabolismo de trealosa constituye un punto de gran interés por sus importantes implicaciones y será discutido más ampliamente en apartados subsecuentes.

5.10.2 Mecanismo de Acción

El mecanismo por el cual la trealosa es capaz de estabilizar membranas en sistemas vivos durante los ciclos de congelamiento-descongelamiento, calentamiento-enfriamiento, y/o deshidratación-hidratación, se encuentra muy relacionado con su conformación molecular. Estudios moleculares de la trealosa en solución, sugirieron que puede proteger contra la desecación durante la deshidratación o congelamiento por reemplazo del agua normalmente asociada con las estructuras biológicas (Donnamaria et al. 1994). Esta actividad podría ayudar a estabilizar estas biomoléculas e inhibir la desnaturalización irreversible. Estudios del potencial de hidratación de la trealosa, comparado con otros oligosacáridos, demuestra que la trealosa tiene una gran habilidad de hidratación. Esto sugiere que la trealosa puede estabilizar la bicapa de lípidos mediante el ordenamiento de moléculas de agua alrededor de la membrana o por la interacción directa con moléculas de agua removidas (Kawai et al. 1992).

Crowe et al. (1990) revisó los mecanismos por el cual la moléculas biológicas son estabilizadas una vez que han sido expuestas a estrés por frío y deshidratación, y concluyó que la protección de proteínas del congelamiento es un proceso inespecífico. Inversamente, la estabilización de proteínas durante la desecación requiere una interacción más específica entre la sustancia estabilizadora y la proteína blanco. Solamente los carbohidratos han mostrado ser efectivos en proteger proteínas durante el proceso de deshidratación. Muchas moléculas son capaces de estabilizar liposomas durante el congelamiento, pero sólo unas pocas son efectivas durante la desecación. La trealosa protege tanto proteínas y membranas de lípidos de la degradación durante el proceso de desecación (Crowe et al. 1990).

Los mecanismos por los cuales la trealosa protege moléculas biológicas pueden ser divididos en tres categorías, denominados reemplazamiento de agua, transformación vidriosa y estabilidad química (Colaco y Roser 1995). Estos tres mecanismos no se excluyen mutuamente y todos pueden contribuir a los efectos estabilizadores de la trealosa. La teoría de reemplazamiento de agua propone que todas las macromoléculas biológicas son normalmente estabilizadas por el agua que forma puentes de hidrógeno alrededor de esas moléculas. La trealosa parece tener una gran flexibilidad en el enlace glicosídico entre las dos moléculas de D-glucosa comparado con otros disacáridos. Esta propiedad podría permitir a la trealosa

interactuar con grupos polares irregulares presentes en las macromoléculas (Colaco y Roser 1995).

La teoría de transformación vidriosa sugiere que los azúcares en solución pueden transformarse en o mantener un estado vidrioso en lugar de cristalizarse. La trealosa es única en el hecho de que forma estructuras vidriosas no higroscópicas que son estables a altas temperaturas cuando se encuentran completamente secas (Crowe y Crowe 2000). Esta propiedad permite a las estructuras vidriosas de trealosa permanecer intactas en rangos muy extremos de temperatura, más que otros azúcares. Este estado vidrioso puede conservar a las biomoléculas en una forma tal que les permita retorna a su estructura nativa y entonces funcionar adecuadamente después de la rehidratación (Franks 1990; Colaco y Roser 1995; Crowe y Crowe 2000).

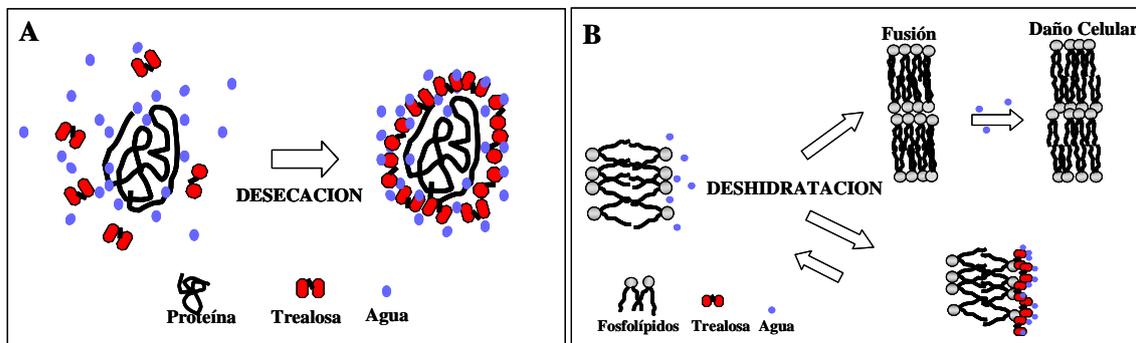


FIGURA 7: Capacidad Osmoprotectora de la trealosa. A) Al disminuir el contenido de agua se forma una capa protectora de trealosa que atrapa el agua disponible en contacto con las proteínas. En la vecindad de las proteínas se incrementa el número de puentes de Hidrógeno entre trealosa-agua y trealosa-trealosa. **B)** Las membranas biológicas son protegidas de la desecación por la trealosa evitando su fusión, cambio de fase y daño celular (adaptado de Lins et al., 2004 y Weisburd 1988).

5.10.3 Biosíntesis en Plantas

Las vías de biosíntesis de trealosa en la naturaleza han sido estudiadas de una variedad de organismos (Avonce et al. 2006, Elbein et al. 2003). Las plantas sintetizan trealosa por la vía conocida como TPS/TPP (Blázquez et al. 1998, Vogel et al 1998). La trealosa es sintetizada en un proceso de dos reacciones: a partir de glucosa-6-P (G6P) y UDP-glucosa se convierte a trealosa-6-fosfato (T6P) por acción de la enzima trealasa fosfato sintasa (TPS); finalmente la T6P es defosforilada a trealosa y fosfato inorgánico por acción de la trealosa-6-fosfato fosfatasa (TPP) (Figura 7).

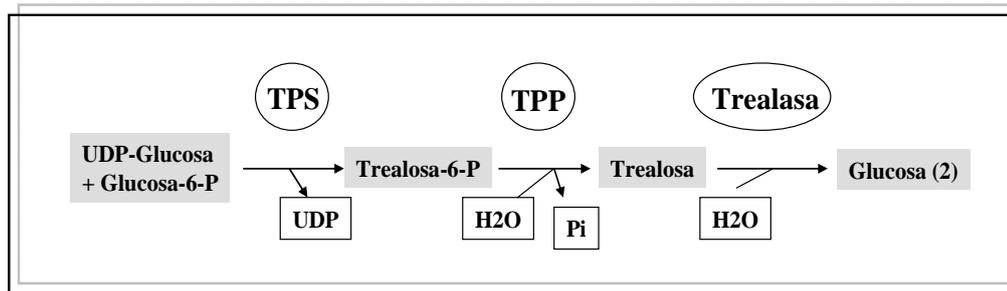


FIGURA 8. Vía biosintética de la trealosa en Plantas.

Los genes que codifican enzimas del metabolismo de trealosa son distribuidos ampliamente en la naturaleza (Avonce et al. 2006). La expresión de los genes *TPS* y *TPP* ha sido detectada en todos los órganos de la planta analizados (Blázquez et al. 1998, Vogel et al. 1998, Eastmond et al. 2002, Vogel et al. 2001). Esos descubrimientos indican que en general, las plantas vasculares tienen la habilidad potencial de sintetizar trealosa (Goddijn y Dun 1999, Blázquez et al. 1998, Vogel et al. 1998, Goddijn y Smeekens 1998, Müller et al. 1999).

5.10.3.1 Homología de Genes Biosintéticos

Eubacterias han demostrado tener todas las vías posibles de síntesis de trealosa, en tanto que Arqueobacterias han perdido la vía de trealosa sintasa. Los Eucariotas tienen predominantemente la vía TPS/TPP, los invertebrados contienen trealosa en la sangre, los vertebrados son incapaces de sintetizar trealosa pero expresan trealasa particularmente en intestino. Es común que en la vía TPS/TPP las enzimas contengan tanto dominios TPS como dominios TPP, sugiriendo que estas enzimas son derivadas de un evento sencillo de fusión genética, heredado a eucariotas antes de la endosimbiosis de cloroplasto (Bell et al. 1998).

Aunque la existencia de biosíntesis de trealosa en plantas superiores ha quedado demostrada, los detalles fisiológicos de las funciones y la regulación de esta vía siguen siendo en gran medida desconocidos. El análisis genético en el genoma completo de *Arabidopsis* reveló que existen un total de 11 genes homólogos *TPS* y 10 genes homólogos *TPP* (Avonce et al. 2006, Leyman et al. 2001, Schlupepmann et al. 2004). Todos los genes homólogos *TPS* además contienen un dominio TPP en el extremo C-terminal de la proteína, en tanto que los homólogos *TPP* son proteínas con un dominio sencillo. La organización de estos genes es única en las plantas superiores, sólo uno o dos copias de *TPS* y *TPP* existen en la mayoría de las bacterias, hongos e insectos, mientras que estos genes constituyen una gran familia de genes en las plantas superiores. Solamente existe un gen que codifica para la trealasa (Müller et al. 2001), evidenciando la radiación existente en torno a la regulación del intermediario T6P en *Arabidopsis* y otras plantas con genomas secuenciados completamente (Avonce et al. 2006, Lunn et al. 2007, Pramanik e Imai 2005, Satoh-Nagasawa et al. 2005, Shima et al. 2007).

El análisis genético entre los numerosos genes homólogos *TPS* y *TPP* sugiere que el proceso evolutivo conserva la especificidad de cada uno de esos genes, debido a que las diferencias entre ellos no son mutaciones al azar y mantienen codones sinónimos en toda la secuencia entera de *TPS* y la mayoría de los genes *TPP* excepto por cinco codones (Avonce et

al. 2006). La alta conservación ocurrida entre los homólogos *TPS* y *TPP* indica que cada uno desempeña una función específica requerida para su conservación.

5.10.4 Efectos Fisiológicos del Metabolismo de Trealosa

El metabolismo de trealosa es un proceso menor dentro del flujo principal de carbono en bacterias, levaduras y célula vegetales. Recientemente se le ha puesto una gran atención debido a los interesantes efectos regulatorios en el crecimiento y la resistencia a estrés en plantas superiores.

En plántulas de *Arabidopsis* creciendo en 25 mM de trealosa ocurre una fuerte reorganización de contenido de carbón: la localización de carbohidratos es invertida a una masiva acumulación de almidón en cotiledones sin acumular en raíz (Wingle et al. 2000). En menor concentración de trealosa (100mM), las plántulas son capaces de germinar y extender cotiledones, pero no desarrollan hojas primarias y la raíz no crece más allá de 5mm (Schluepmann et al. 2004). Interesantemente, el meristemo radicular es reducido en tamaño y las células en la zona de extensión se hinchan y estallan. Si se adicionan azúcares metabolizables en estas condiciones se superan los efectos en la inhibición del crecimiento de la trealosa, sugiriendo que la inanición causa el arresto en el crecimiento, lo anterior sugiere además que la trealosa no afecta la capacidad de los tejidos vertederos de metabolizar carbón ya distribuido (Schluepmann et al. 2004).

Los efectos diversos observados en plántulas de *Arabidopsis* creciendo en presencia de trealosa, exponen la serie de eventos del metabolismo y crecimiento de células vegetales en donde se encuentra implicada la trealosa y sus metabolitos intermedios. En primera instancia interfiere con la distribución y transporte de carbohidratos, al inducir fuerte acumulación de almidón, afectando el proceso de transporte de carbón provocando inanición en las células. Efectos detrimentales en el crecimiento son expuestos en el desarrollo primario de semillas en germinación, adicionalmente interfiere con procesos de división celular, evidenciado en células de meristemo radical. Los efectos observados son dependientes de la presencia de altas concentraciones de trealosa y una fuente no metabolizable de carbón.

5.10.4.1 Crecimiento y Desarrollo

El desarrollo de plantas puede ser visto como una serie de eventos programados en el que las vías metabólicas y de crecimiento tienen fuentes comunes. Las implicaciones del metabolismo de trealosa y sus efectos sobre el metabolismo y crecimiento la colocan como una molécula que representa una misma señal de regulación que integra ambos procesos.

Nivel de T6P controla el metabolismo primario indispensable en el desarrollo. Plantas transgénicas con diferentes contenidos de T6P mostraron los efectos en el fenotipo desarrollado por acción de este metabolito; el fenotipo marcadamente contrastante entre plantas con bajo y alto contenido de T6P (Schluepmann et al. 2003). Altas concentraciones de T6P, induce el desarrollo de hoja de un verde intenso y un rápido crecimiento, en contraste bajas concentraciones de T6P provoca un retardo en el desarrollo de hojas con respecto a plantas silvestres y alta disponibilidad de azúcar inhibe fuertemente el crecimiento en estas plantas. Análisis de genes inducidos por altas concentraciones de T6P correlacionan los niveles de este metabolito con la expresión del regulador del metabolismo central *AtKIN11*

(Schluepmann et al. 2004), entonces la T6P podría controlar el metabolismo primario ya sea directamente como regulador alostérico o como molécula de señalización en cascadas de transducción que regulan la actividad de estas enzimas para la utilización de carbón. Schluepmann et al. (2003) propone que la participación de la T6P en el desarrollo requiere necesariamente una estricta regulación en su contenido que controle la utilización de carbohidratos en diferentes tejidos y durante diferentes las etapas del desarrollo. Esta idea esta soportada por la existencia de numerosos genes homólogos *TPS* y *TPP* encontrados en *Arabidopsis*.

Genes de la vía de trealosa son requeridos para el desarrollo de la inflorescencia en maíz. En maíz se ha comprobado que el gen *TPP* (*RAMOSA3*) controla la ramificación de la inflorescencia. Este gen *RAMOSA3* en maíz es expresado localizadamente en meristemos axilares, interactuando con un regulador transcripcional (*RAMOSA1*), sin embargo no se ha conocido como es que sucede la interacción entre la actividad TPP, la expresión genética del mismo y la regulación transcripcional (Satoh- Nagasawa et al. 2006).

T6P es indispensable en el desarrollo embrionario en Arabidopsis. La interrupción del gen *tps1* en *Arabidopsis* ocasiona un fenotipo embrio-letal, lo que indica que la producción de T6P es esencial en el desarrollo embrionario (Eastmond et al. 2002). Un análisis detallado mostró que lo embriones se arrestan en etapa de torpedo, etapa en la que se acumulan vastas cantidades de sacarosa para la síntesis de lípidos de reserva y proteínas y precisamente se observa una dramática acumulación de almidón y sacarosa en estos embriones. Tal observación indica un absoluto requerimiento de la enzima TPS o de T6P durante la embriogénesis para la utilización de sacarosa por el embrión y que el contenido de T6P controla la utilización de carbohidratos (Eastmond et al. 2002). Paralelamente a este estudio, se reportó que mutantes para la TPS en *Drosophila* son embrio-letales (Chen et al. 2002), lo que confirma tal requerimiento. Posteriormente fue comprobado que la acumulación de almidón y azúcares solubles es resultado de una disminución más que bloqueo del flujo de carbono y probablemente este efecto ocasiona la interrupción en el proceso de maduración embrionaria y que tal acumulación de carbohidratos, es suficiente para bloquear las señales dentro del programa de maduración (Gómez et al. 2006).

T6P esta implicada en el control de la división celular. El análisis subsecuente de embriones *tps1* indicaron que efectivamente controla el crecimiento embrionario pero no la diferenciación celular donde es posible encontrar cloroplastos completamente diferenciados (Gómez et al. 2006). Según este estudio, los retardos progresivos observados en la morfología embrionaria indican un papel de la división celular tan o más importante que las afectaciones mismas en el metabolismo de carbono. Las paredes en embriones *tps1* son más gruesas comparadas a embriones tipo silvestres en varias etapas de desarrollo; adicionalmente los transcritos de varios genes involucrados en la síntesis de la pared celular se encontraron fuertemente alterados. Lo que permitió concluir que *TPS* en *Arabidopsis* modula el crecimiento por medio del control de la deposición de la pared celular y la división celular (Gómez et al. 2006). Recientemente ha sido comprobado por Chary et al. (2008) que el gen *AtTPS6* el cual es expresado en toda la planta, controla la morfología celular y modifica el crecimiento y desarrollo en *Arabidopsis*.

TPS es requerido para la transición floral en Arabidopsis. Plantas con reducida expresión de *TPS*, presentan retardo en el crecimiento y reducida área foliar, asimismo no ocurre la transición fenológica de la etapa vegetativa a etapa reproductiva retardando la floración respecto a plantas tipo silvestre (van Dijken et al. 2004). Otro efecto observado fue el deceso dramático en la región del meristemo radical además del menor crecimiento de la hoja.

5.10.4.2 Metabolismo de Carbón

Señalización del contenido de azúcar. Se ha demostrado recientemente en *Arabidopsis*, mediante la utilización de un método muy sensible para la determinación de los niveles T6P, que cambios en los niveles de sacarosa se correlacionan con cambios rápidos en contenido de T6P en el citosol y, a su vez puede estimular la síntesis de almidón en cloroplasto. Por lo tanto, la T6P podría tener una función de señalización del contenido de azúcares y la utilización de sensores entre citosol y cloroplastos (Kolbe et al. 2005, Lunn et al. 2006).

Niveles de T6P determinan la capacidad de utilización de azúcares. Plantas transgénicas de *Arabidopsis* con diferentes contenidos de T6P mostraron efectos en el crecimiento cuando son mantenidas en un ambiente de alta disponibilidad de azúcares. Plantas con bajo contenido de T6P presentan menor crecimiento en alta disponibilidad de glucosa, fructosa o sacarosa; en tanto que plantas con alto contenido de T6P crecen óptimamente en presencia de sacarosa (Schluepmann et al. 2003). Tales observaciones indican que la T6P es responsable de los efectos en hábitos de crecimiento y desarrollo y la capacidad de utilización de azúcares disponibles se encuentran directamente relacionados a los niveles de este metabolito.

Regulación de la Síntesis de Almidón. Así mismo se ha revelado una función específica de los genes en la biosíntesis de almidón; puesto que se comprobó que la presencia de trealosa induce la expresión de *ApL3*, que codifica la subunidad grande de la ADP-glucosa pirofosforilasa en *Arabidopsis* (Wingler et al. 2000, Fritzius et al. 2001). Posteriormente fue demostrado que la T6P regula directamente la síntesis de almidón vía activación redox de la ADP-glucosa pirofosforilasa, que tiene implicación directa en la utilización de azúcares (Kolbe et al. 2005; Lunn et al. 2006).

T6P inhibe SnRK1. La regulación de la síntesis del almidón y utilización de carbón, por sí sola no explica los fenotipos observados en plantas transgénicas con diferentes contenidos de trealosa y metabolitos de trealosa. Recientemente se ha reportado que la T6P inhibe a SnRK1 de la familia de proteína cinasas independientes de calcio (Zhang et al. 2009). Estas proteínas cinasa tienen un rol fundamental en la regulación transcripcional del metabolismo y desarrollo en respuesta a limitaciones de energía e inanición por fuentes de carbono. En plantas SnRK1 activa el proceso metabólico bajo condiciones de estrés por inanición inhibiendo reacciones anabólicas que consumen ATP. (Hardie et al. 2007). Concentraciones micromolares de T6P, inhiben la actividad de SnRK1 en un sitio distinto de su dominio catalítico a través de un intermediario desconocido. La mayor inhibición ocurre en plántulas, en hojas jóvenes de crecimiento activo y en otros órganos a excepción de hojas maduras. De manera general, bajos niveles de T6P permiten la regulación transcripcional de SnRK1; en tanto que altos niveles de T6P inhiben la actividad de SnRK1, por lo tanto la T6P promueve las reacciones

biosintéticas en tejidos en crecimiento a través de la inhibición de SnRK1 en respuesta a la disponibilidad de sacarosa (Hardie et al. 2007).

T6P regula la capacidad fotosintética. Altos niveles de T6P en tabaco y *Arabidopsis* conducen también a una alta capacidad fotosintética por unidad de área debido a alto contenido de Rubisco y clorofila. Bajo contenido de T6P producen el fenotipo contrario de baja capacidad fotosintética por unidad de área, pero paradójicamente plantas más productivas donde el área foliar es más grande lo que representa mayor fotosíntesis por planta (Pellny et al. 2004). El impacto del metabolismo de carbohidratos en el balance entre capacidad fotosintética y producción por unidad de área es un tema muy poco estudiado, los datos presentados por Pellny et al. (2004) sugieren que el efecto regulatorio de la T6P en la utilización de carbohidratos y señalamiento es un factor que influye el proceso fotosintético y ofrece una atractiva oportunidad de mejorar el rendimiento vegetal.

Metabolitos de trealosa modulan la respuesta a estrés abiótico. La expresión de genes de la ruta biosintética de trealosa en plantas conduce a una tolerancia a sequía. El primer reporte de la expresión de genes de *E. coli* (*otsA* y *otsB*) por Pilon-Smits et al. (1998) demostraron que era posible inducir tolerancia a sequía por acción de trealosa y metabolitos intermedios, sin embargo también se reportaron aberraciones en el crecimiento. A la fecha no se conoce el mecanismo exacto por el que el metabolismo de trealosa puede regular la protección contra estrés abiótico. Plantas sensibles a la sequía solo producen cantidades traza de trealosa y en plantas transgénicas con diferentes modificaciones para la biosíntesis de trealosa, los niveles de trealosa no se correlacionan necesariamente con el grado de tolerancia observado, ni tampoco se revela algún tejido que muestre efectos localizados en lineajes celulares específicos (Schluepmann et al. 2009). Resistencia a sequía, frío y salinidad ha sido alcanzada en numerosas plantas tanto monocotiledóneas (Garg et al. 2002, Jang et al. 2003) y dicotiledóneas (Karim et al. 2007, Miranda et al. 2007).

Tabla 2. Evidencia del papel de la biosíntesis de la trealosa en la regulación de metabolismo de carbón en plantas. (Modificado de Wingler 2002)

<i>Molécula activa</i>	<i>Vía o Proceso Regulado</i>	<i>Planta</i>	<i>Referencia</i>
T6P	Acumulación de azúcar durante sequía	Tabaco expresando <i>otsA</i>	Pilon-Smits et al. 1998
T6P	Capacidad fotosintética	Tabaco expresando <i>otsA/otsB</i> .	Paul et al. 2001
T6P	Maduración de embriones	<i>Arabidopsis</i> con interrupción del gen <i>TPS1</i>	Eastmond et al. 2002
T6P	Morfogénesis celular	<i>Arabidopsis</i>	Chary et al. 2008
Trealosa	Biosíntesis de fructanos en hojas	Cebada con adición de trealosa en hojas	Müller et al. 2000
Trealosa	Contenido de carbohidratos en raíz y nódulos	Soya tratada con valA	Müller et al. 1995
Trealosa	Metabolismo de sacarosa en raíces	Soya con adición de trealosa	Müller et al., 1998
Trealosa	Biosíntesis de almidón en cotiledones y hojas	<i>Arabidopsis</i> con adición de trealosa	Wingler et al. 2000
Trealosa	Biosíntesis de almidón en cotiledones y hojas	<i>Arabidopsis</i> con adición de trealosa	Fritzius et al. 2001
Trealosa	Ramificación de inflorescencia	Maíz	Satoh-Nagasawa et al. 2006

5.10.5 Regulación del Metabolismo de Trealosa

Debido a que cambios en los niveles de T6P inducen grandes cambios en el metabolismo y desarrollo de la plantas, es necesariamente probable una regulación estricta en la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de T6P. En *Arabidopsis* la expresión de algunos genes *TPS* y *TPP* responden fuertemente a cambios en los niveles de azúcar, incluyendo la exposición a trealosa, que incrementa los niveles de T6P. (Schluepmann et al., 2004). Se ha especulado que la biosíntesis de trealosa es un proceso regulado durante el crecimiento de las plantas y su desarrollo, y que cada gen *TPS* y *TPP* se encuentra bajo una regulación específica.

La expresión de estos genes es regulada diferencialmente durante el desarrollo embrionario, senescencia, disponibilidad de azúcar y nitrógeno, hipoxia, ritmo circadianos, ácido abscísico (ABA) y trealosa externa (Schluepmann et al. 2004). En *Arabidopsis* genes *TPS* y *TPP* responden fuerte y rápidamente a señales hormonales y disponibilidad de nutrientes; genes *TPS* responden en general a bajo contenido de azúcares y ausencia de almidón, en tanto que *TPP* se ven reprimidos bajo estas condiciones (Tim et al. 2004). Genes *TPP* y trealosa son inducidos por bajo contenido de oxígeno (Liu et al. 2005). La regulación hormonal esta presente: *TPS1* es regulado en células guarda por ABA (Leonhardt et al. 2004) así como genes *TPP* de arroz (Pramanik e Imai 2005) y *TPS8* es inducido por citocininas. Las condiciones ambientales también son importantes reguladores: *TPS5* y *TPS8* son inducidos por oscuridad (Plipo et al. 2006) y *TPS9*, *TPS10* y cuatro genes *TPP* son regulados por nitratos (Bremer et al. 2005)

5.10.6 Biosíntesis en condiciones de estrés abiótico

El análisis de transcritos involucrados en el estrés abiótico y defensa vegetal entre otros realizado por Bae et al. (2005) en *Arabidopsis*, muestra que los transcritos que responden a un tratamiento con trealosa fueron aquellos que se encuentran asociados con señales de estrés abiótico más que de estrés biótico. Este perfil de transcripción muestra que es más la represión de transcritos involucrados con la respuesta vegetal y estrés abiótico en respuesta a trealosa que aquellos que fueron inducidos.

Recientemente una clona EST de algodón con homología al gen *TPS* de *Arabidopsis* ha sido encontrado que es inducida bajo condiciones de estrés hídrico, indicando la biosíntesis de trealosa es específicamente inducida bajo esas condiciones. Aunque la relevancia de este dato permanece sin ser del todo dilucidado, esto contribuye a acumular evidencia circunstancial que el metabolismo en plantas superiores juega un rol principal en la adquisición de tolerancia a estrés (Goddijn y Dun 1999).

En trigo, la acumulación de trealosa fue observado bajo condiciones de estrés salino y por sequía, lo cual refleja las propiedades de protección de la trealosa contra condiciones de estrés (El-Bashiti et al. 2005). Recientemente en arroz, la sobreexpresión del gen *TPP1* endógeno mostró tras la realización de análisis de expresión que el gen *TPP* fue transitoriamente inducido por tratamientos salinos, osmóticos y con ABA pero discretamente inducido bajo estrés por frío. La sobre expresión de *OsTPP1* en arroz aumentó la tolerancia a estrés salino y por frío, y desencadena la expresión de genes de respuesta a estrés abiótico (Ge et al. 2008) lo

cual sugiere la posibilidad de una vía de regulación transcripcional de respuesta a estrés inducido por la expresión de *OsTPPI*.

5.10.7 Aplicación del Metabolismo de la Trealosa para el Mejoramiento de Cultivos

A raíz de la comprensión del metabolismo de la trealosa se hipotetizó que la introducción de la capacidad para sintetizar trealosa en cultivos vegetales podría mejorar su comportamiento bajo condiciones de sequía. Con el propósito de introducir esta ruta biosintética en plantas, se desarrollaron plantas transgénicas de papa (*Solanum tuberosum*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) introduciendo mediante el sistema de *Agrobacterium* los genes *otsA* y/o *otsB* de *Escherichia coli*. A pesar de la expresión de ambos genes, solamente se detectaron cantidades muy limitadas de trealosa en las plantas transgénicas de tabaco (Goddijn et al. 1997). En base a los reportes referentes a la presencia de actividad trealasa en gran variedad de plantas, particularmente en nódulos radiculares de leguminosas (Müller et al. 1992), se estudió el efecto de la presencia de trealasa en la acumulación de trealosa de las plantas transgénicas determinándose que la actividad de la enzima trealasa afectaba la acumulación.

Utilizando el inhibidor específico Validamicina A, se encontró no solamente que la inhibición de dicha enzima permitía una acumulación de trealosa en dichas plantas, si no que contrario a lo que se creía que la capacidad para sintetizar trealosa no estaba restringida en ciertas especies tolerantes a sequía, encontrándose también en angiospermas. Esta conclusión se originó como resultado de la inhibición de la enzima trealasa en plantas silvestres de tabaco, en donde ocasionó un incremento en la concentración de trealosa. Además de que en ambos casos, plantas transgénicas y silvestres, se encontró un incremento en la tolerancia a sequía (Goddijn et al. 1997, Pilon-smits et al. 1998).

Sin embargo, la expresión de estos genes conduce a efectos pleiotrópicos, incluyendo alteraciones en el crecimiento y en el metabolismo bajo condiciones de crecimiento normal. Con el tiempo se han documentado diversas estrategias para evitar los fenotipos observados en la acumulación de trealosa, como la co-expresión regulada de genes *TPS/TPP* (Garg et al. 2002; Jang et al. 2003) y más recientemente la expresión de estos genes regulados por promotores inducidos específicamente por estrés (*AtRAB18* y *AtRbcS1A*) o señales de localización en cloroplastos (Karim et al. 2007).

Garg et al. (2002) reportó la expresión regulada de los genes *otsA* y *otsB* de *E. coli* como un gen de fusión para manipular la tolerancia al estrés en arroz. Dependiendo de las condiciones de crecimiento, las plantas transgénicas acumulan 3 a 10 veces más que plantas control, sin embargo las concentraciones permanecen abajo del mg por gr de peso fresco. La acumulación de trealosa se relaciona con niveles altos de carbohidratos solubles y una elevada capacidad fotosintética bajo condiciones control y estrés, consistente con la propuesta de su papel como modulador de el monitoreo de azúcares y metabolismo de carbohidratos.

Jang et al. (2003) reporta así mismo la fusión bi-funcional de genes *otsA* y *otsB* de *E. coli* en arroz como herramienta para evitar modificar los niveles de T6P y con eso evitar los posibles efectos negativos de la sobreproducción de trealosa. Los niveles de acumulación

alcanzados fueron de arriba de 1.076 mg por gramo de peso fresco, sin mostrar inhibición de crecimiento o alteraciones fenotípicas visibles; asimismo estas plantas mostraron tolerancia incrementada a la sequía salinidad y frío medido por el contenido de clorofila y análisis de inhibición del crecimiento.

En tomate la introducción del gen *TPSI* de levadura resulta en la acumulación de más almidón y es mayor el contenido de clorofila en las hojas (Cortina y Culiñez 2005). Se observó el aumento de tolerancia a diversos estreses abióticos como tratamientos de sequía salinidad y estrés oxidativo.

Miranda et al. (2007), reportaron una enzima bifuncional (TPS-TPP) de levadura pero expresada en *Arabidopsis*, logrando acumulación de trealosa a bajos niveles pero con incremento significativo en la tolerancia a sequía, congelamiento, salinidad y calor. Ge et al. (2008) reporta la sobreexpresión del gen de la trealosa-6-fosfato fosfatasa (*OsTPPI*) en arroz, resultando en el aumento de tolerancia a estrés salino y frío.

El hecho de que muy bajas concentraciones de trealosa pueden mejorar la resistencia a la sequía implica mecanismos de señalización o regulación más que una función osmoprotectora resultado de su acumulación (Shima et al. 2007). Se ha observado que en plantas transgénicas que no acumulan significativamente más trealosa que controles, muestran una misma tolerancia a la sequía que plantas con una mayor producción (Karim et al. 2007) esto indicaría que no es la trealosa por sí misma la que conduce a la mejora de la tolerancia a sequía si no más bien metabolitos intermediarios específicamente T6P (Schluepmann et al. 2003, Bae et al. 2005a, b; Ramón et al. 2007, Shima et al. 2007); sin embargo, las señales precisas y mecanismos del aumento a la tolerancia a la sequía son desconocidos aún.

5.11 Trealasa

La trealasa es una enzima glicosil hidrolasa (α , α -trealosa-1-C-glucohidrolasa, E.C. 3.2.1.28), única enzima capaz de catalizar la conversión de trealosa a dos unidades monoméricas de glucosa. Una enzima que hidrolizara trealosa fue observada primero en *Aspergillus niger* (Bouquelot 1893) y enseguida por Fischer (1895) de *S. cerevisiae* (revisado en Elbein 1974). A partir de entonces, la trealasa ha sido reportada en muchos otros organismos procariotas y eucariotas (Elbein et al. 1974). En plantas hongos, animales y bacterias la única vía de degradación de trealosa ocurre por la vía de la enzima trealasa (Müller et al. 1995). En *Euglena gracilis* y *Pichia fermentans*, por la acción de la trealosa fosforilasa (Belocopitow y Maréchal 1970, Schick et al. 1995); en *E. coli* por fosforilación y subsecuente hidrólisis por trealosa-6-fosfato hidrolasa (Rimmele y Boos 1994).

5.11.1 Isoformas

En el reino Fungi las trealosas han sido caracterizadas en distintas especies agrupándolas en dos grupos principales: trealosas ácidas y trealosas neutras. Una forma inactiva de trealasa fue reportada en *S. cerevisiae* activada por fosforilación dependiente del AMP cíclico localizada en el citoplasma (Thevelein 1984). Sin embargo, una segunda actividad de trealasa

fue identificada en las vacuolas de esas células, la cual fue activa pero de manera constitutiva (Londesborough y Varimo 1984). Las dos trealosas fueron caracterizadas parcialmente de acuerdo a su pH óptimo, la enzima citoplasmática exhibió su actividad en un pH cercano a 7 y fue llamada trealasa neutral, mientras que la proteína de la vacuola exhibió su máxima actividad a pH de 4.5 y fue nombrada como trealasa ácida (van Solingen y van de Platt, 1975, Keller et al. 1982).

5.11.1.1 Trealasa Neutral

La trealasa neutral citoplásmica es específica para la trealosa como sustrato, sin capacidad de hidrolizar otros glucósidos como celobiosa, maltosa, lactosa, sacarosa, rafinosa y melobiosa (App y Holzer 1989). La Km de la enzima para la trealosa es cercana a 3.5 mM, en un ambiente donde la levadura puede acumular trealosa por arriba del 23% de su peso seco. La trealasa neutral fue propuesta en tener considerable significancia fisiológica al mantener o disminuir las concentraciones de trealosa en levaduras, en las cuales ha sido demostrado que la trealosa actúa como un regulador del metabolismo y puede afectar la actividad de enzimas clave tal como la hexocinasa (Dellamora-Ortiz et al. 1986).

5.11.1.2 Trealasa Ácida

La trealasa ácida o vacuolar también muestra ser muy específica para la trealosa como sustrato. Esta trealasa presentó un Km de 4mM para la trealosa, la cual es más baja que para la trealasa neutral. La supresión del gen para esta proteína en levadura, ocasiona la imposibilidad de crecer en presencia de trealosa como única fuente de carbono (Nwaka et al. 1996), indicando el papel clave de esta trealasa en la utilización de la trealosa. Una hipótesis desarrollada para explicar la función de esta enzima, implica que la trealasa ácida sea movilizada de su sitio de síntesis a el espacio periplásmico del retículo endoplásmico y aparato de Golgi, donde se une a la trealosa exógena para internalizarla y romperla en la vacuola para producir glucosa libre (Stambuck et al. 1996).

Ha sido reportado que las actividades de la trealasa neutral y ácida son bajas en células de levadura creciendo exponencialmente pero altas durante la fase estacionaria, después de que la glucosa ha sido agotada (Winkler et al. 1991); además, la expresión de los genes para estas enzimas es baja en células creciendo exponencialmente comparada con células en fase estacionaria, sugiriendo que esos genes son reprimidos por glucosa (Nwaka et al. 1995). La fase estacionaria de células de levadura tiene niveles incrementados de trealosa citoplásmica y además niveles altos de actividad trealasa; esta alta expresión de trealosas en la fase estacionaria así como los niveles de trealosa pueden contribuir a la alta tolerancia al estrés en esas células.

5.11.2 Trealasa en Plantas

Inicialmente la enzima trealasa fue encontrada en muy distintas fuentes en plantas, en cultivos de tejidos de la gimnosperma *Picea*, de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas lo que permiten concluir que no estaba confinada a polen y que posiblemente la actividad trealasa esta presente en la mayoría de las plantas vasculares de todos los grupos taxonómicos (Kendall et al. 1999). Para el caso de las plantas vasculares se han identificado una copia del gen de trealasa, y su funcionalidad ha sido reportada en soya (*Glycine max*) (Aeschbacher et

al. 1999) y *Arabidopsis* (Müller et al. 2001). Recientemente ha sido reportada la secuencia de trealasa en arroz adicionalmente a las ya reportadas de alfalfa, papa y caña de azúcar (Gen Bank AC051634.6).

Aunque la longitud de transcritos de los genes de trealosas vegetales, son comparables en longitud (aproximadamente 2.2 kb conteniendo 10 exones), la estructura primaria de la proteína parece variar de especie a especie. En primera instancia la longitud completa de la trealasa aislada de *Arabidopsis* (*AtTRE1*) es 626 residuos más larga comparada con los 5563 residuos de trealasa de Arroz (*OsTRE*) y los 557 residuos de soya (*GmTRE*) (Frison et al. 2007).

La trealasa de la soya es una glicoproteína apoplástica (Aeschbacher et al. 1999). En *Arabidopsis* se localiza unida a la membrana plasmática con el dominio catalítico orientado hacia la pared celular, el anclaje se lleva a cabo a través de un dominio transmembranal en el extremo N-terminal que la incluye en la vía secretoria (Frison et al. 2007). La localización y topología de esta enzima, permite inferir que el sustrato trealosa necesariamente requiere ser exportado hacia el exterior de la célula donde es hidrolizado. Sin embargo según la secuencia de aminoácidos la trealasa de soya y arroz carece de dominio transmembranal, localizándose probablemente como enzima de secreción y soluble; pero contradictoriamente carece de señales de translocación al retículo endoplasmico, indicando posibles defectos en la secuencia disponible.

En *Arabidopsis* la actividad específica es de 280 nkat g⁻¹ prot en flor, la actividad localizada más alta reportada para esta planta (Müller et al. 2001). Se ha demostrado que la actividad trealasa está presente en varios tejidos de *Arabidopsis* (Müller et al. 2001) y también el análisis transcripcional muestra una expresión extendida y diferencial en todos los órganos vegetales particularmente alta en flores y enriquecida en fracción membranal (Frison et al. 2007). Lo que potencialmente podría indicar la participación de la Trealasa en la reproducción y/o en la arquitectura floral; paralelamente con esta idea, se ha reportado que genes biosintéticos de trealosa controlan la arquitectura de la inflorescencia en maíz (Sato-Nagasawa et al. 2006).

Müller et al (1992) comprobó inicialmente que la trealasa presente en plantas es capaz de metabolizar trealosa de distintas fuentes tanto exógenas como endógenas. Precisamente este aspecto ha sido de relevancia en el posible papel de la trealasa en la interacción con microorganismos simbióticos y patógenos de plantas productores de trealosa, que pueden explotar sus efectos sobre la regulación de azúcares en plantas. En este aspecto la enzima trealasa distribuida ampliamente entre plantas superiores y encontrada en varios tejidos, puede proveer protección contra posibles efectos detrimentales de la trealosa durante las interacciones planta–microorganismo (Müller et al. 1995, Aeschbacher et al. 1999) con mayor importancia en raíz (Broodman et al. 2002)

Cuando se realizaron las primeras investigaciones realizadas para la modificación de biosíntesis de trealosa en plantas mediante la integración de genes biosintéticos se obtuvieron cantidades limitadas de trealosa (Hölmstrom et al. 1996, Pilon-Smits et al. 1998, Romero et al. 1997). Posteriormente se pudo comprobar que el bajo nivel de acumulación de trealosa se debía a la actividad hídrolítica de trealasa en plantas transgénicas de *Solanum tuberosum*

(Goddijn et al. 1997). La inhibición específica de la trealasa con Validamicina A resultó en una mayor acumulación de trealosa en plantas transgénicas y también en plantas no transformadas de papa y tabaco, lo que indica el papel de trealasa en el mantenimiento de bajos niveles de trealosa y a su vez corroboró la capacidad dispersa de las plantas de sintetizarla naturalmente, bajo estricta actividad hidrolítica de la trealasa (Goddijn et al 1997).

5.11.3 Efecto de Activadores e Inhibidores

Respecto a los posibles inductores de la actividad trealasa, se ha observado en primera instancia que la trealosa no es un inductor importante de su actividad puesto que plantas creciendo por un largo periodo en trealosa no mostraron un incremento importante en nivel de actividad trealasa (Müller et al. 1995). Adicionalmente durante el proceso de infección de *Arabidopsis* por patógenos productores de trealosa, la actividad trealasa fue inducida anterior a la acumulación de trealosa, descartando que la trealasa sea inducida por el sustrato (Broodmann et al. 2002).

Iones Metálicos. Evaluaciones de actividad de trealasa aislada de nódulos de raíz de *Phaseolus vulgaris* muestra el papel de los iones metálicos en la actividad de esta enzima. Los iones Na^+ y Mn^{2+} contribuyen al incrementar su actividad moderadamente, contrario a los iones Na^+ y Mg^{2+} que fueron fuertes inductores. En contraparte EDTA y Fe^{3+} se destacan como inhibidores potentes (Müller et al. 1992, Tejera et al. 2005).

Reguladores de crecimiento. Las auxinas pueden presentarse como reguladores de la actividad trealasa. En raíces tratadas con la auxina natural Acido Indolacético (AIA) y la auxina sintética 2,4-D, la actividad trealasa incrementa rápidamente; adicionalmente fueron observados efectos antagonistas por acción de ABA mostrando con ello un comportamiento típico de los reguladores de crecimiento (Müller et al. 1994).

Ambiente celular. El análisis de la trealasa en *Arabidopsis* revela una expresión transcripcional tejido específica, por lo que en tejidos vegetativos donde es menor la actividad trealasa es posible que exista una regulación post-transcripcional no conocida aún (Frison et al. 2007). La actividad trealasa y transcritos se ha visto que son regulados positivamente en tejidos vegetales por estrés biótico en la interacción con microorganismos y patógenos (Aesbacher et al. 1999, Brodmann et al. 2002), así como estrés abiótico por baja disponibilidad de oxígeno (Liu et al. 2005) y sequía en *Arabidopsis* (Rolland et al. 2006).

Validamicina A. Es un potente inhibidor de la trealasa en plantas (Kendall et al. 1990; Müller et al. 1992) y ha sido ampliamente utilizado en el estudio de las posibles funciones de trealasa y en mayor medida en el estudio de metabolitos intermedios del metabolismo de trealosa (T6P) (Schluepmann et al. 2009). La inhibición de la trealasa por la acción de la Validamicina A (valA) tiene efectos discretos en el metabolismo de las plantas. *Arabidopsis* tratada con valA no refleja efectos observables en la morfología y desarrollo de la planta (Müller et al. 1995, 2001) o en la expresión de enzimas metabólicas importantes (Wingler et al. 2000).

La valA es un metabolito secundario de *Streptomyces hygroscopicus* con actividad antifúngica contra patógenos de plantas (Iwasa et al. 1971). Este compuesto ha sido utilizado

como control de patógenos como *Pellicularia sasakii* y *Rhizoctonia solani*; ocasionando anomalías en el crecimiento del hongo y por ende disminuyendo su virulencia (Iwasa et al. 1971). ValA muestra una alta especificidad como inhibidor de trealasa fúngicas, puesto que no inhibe significativamente otras glicohidrolasas, además de la trealasa (Asano et al. 1987) aunque parece reprimir la inducción de varias hidrolasas. La valA y compuestos relacionados son también potentes inhibidores de trealasa presentes en insectos y tienen un potencial insecticida (Asano et al. 1987); cuando se le administra a *Bombyx mori*, ocasiona un fuerte incremento en el nivel de trealosa, seguido por la muerte de la larva (Kono et al. 1993).

5.11.4 Implicaciones en el Metabolismo de Carbohidratos

La expresión de trealasa en plantas transgénicas de *Arabidopsis* efectivamente mantienen bajo el contenido de trealosa y no afecta el contenido de T6P (Schluepmann et al. 2003). En *Arabidopsis*, la trealosa induce cambios en las enzimas de la ruta biosintética de almidón, pero la inhibición de trealasa a través de la adición de valA con la consecuente acumulación de trealosa, no tiene efecto sobre estas enzimas (Wingler et al. 2000). En *Arabidopsis* ensayos de inhibición con valA, provocan acumulación de trealosa, no existen cambios significativos en el contenido de glucosa, fructosa y rafinosa en todos los órganos analizados; sin embargo si conduce a una alteración en el contenido de carbohidratos no estructurales dado que se observa que almidón y sacarosa disminuyen en flor, hoja y tallo significativamente (Müller et al. 2001) confirmando lo encontrado en *Glycine max* y *Vigna unguiculata* (Müller et al. 1995).

Por los efectos observados respecto a alteración del contenido de carbohidratos solubles y almidón, Müller et al. (2001) proponen a la trealasa como censor de azúcares y regulador de la localización de carbón; a través, por ejemplo de la interacción con sacarosa u otro azúcar que finalmente provoque cambios en la percepción del contenido de azúcares por proteínas de membrana.

5.11.5 Actividad enzimática bajo estrés abiótico

Como se ha discutido antes, los niveles de trealosa son fuertemente inducidos en varias células cuando se encuentran expuestas a una variedad de estrés ambiental; entonces en algunos casos la trealasa puede jugar un papel en la remoción de trealosa y regresar a la célula al estado de homeostasis una vez que el estrés ha terminado. Sin embargo es posible que la trealosa tenga un papel más activo en condiciones de estrés.

Mediante análisis de actividad específica en el trigo *Triticum* sp sometido a sequía se infiere que la trealasa puede ser específicamente regulada bajo estrés abiótico (El-Bashiti et al. 2005). Variedades sensibles a salinidad y sequía presentan altos niveles de actividad trealasa tanto en condiciones de riego y estrés. Sin embargo es interesante la observación que, en variedades resistentes a sequía y salinidad, existe un 50% de disminución en actividad trealasa de raíz. Lo anterior puede indicar un papel específico de la trealasa en la adquisición de tolerancia a estrés abiótico en Gramíneas. Ciertamente esta enzima merece más investigación para entender su papel en la obtención de energía y el metabolismo de carbón y en el entendimiento de varios papeles de su sustrato la trealosa.

METODOLOGIA

6.1 Material Vegetal

6.1.1 Arroz (*Oryza sativa* L. subespecie *Indica*)

Los experimentos fueron realizados en dos variedades mexicanas de arroz de la subespecie *Indica*, una variedad sensible a sequía Morelos A98 y una con tolerancia a sequía Temporalero A95. Las semillas fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Unidad Zacatepec a través de la Ing. Leticia Távitas Fuentes.

Morelos A98: Se obtuvo del cruzamiento triple entre los progenitores IR62/LP4-861/LP34-86, y en cinco ciclos de selección se formó la línea uniforme CAEZ 202-111-87, liberándose en el Campo Experimental “Zacatepec”. Sistema de cultivo: Transplante bajo Riego; potencial de rendimiento de 10 ton/ha.

Temporalero A95: Proviene de una cruce simple entre BG90-2/IR 2863-38-1 realizada en el Instituto Internacional de Investigaciones Arroceras (IRRI) de Filipinas, la cual se liberó en el Campo Experimental de Edzná, Campeche. Resistente a deficiencia de humedad; sistema de cultivo: Temporal y Temporal con Riego de Auxilio; potencial de rendimiento de 4.6 ton/ha temporal y 6.3 ton/ha temporal con riegos de auxilio. Las plantas presentan excelente vigor lo que les permite competir contra las malezas.

6.1.2 Tabaco (*Nicotiana tabacum* L)

- Semillas de Tabaco variedad *Xanthi*. Proporcionadas en el Laboratorio de Transformación Genética de Plantas del CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato.
- Semillas T0 portadoras del plásmido 35S: TREAs ó rd29A: TREAs, proporcionadas por el Departamento de Microbiología de la FCB-UANL.

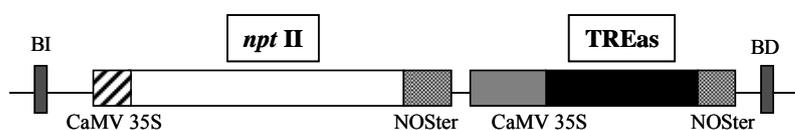
6.2 Ácidos Nucleicos

6.2.1 Vectores de expresión de RNA antisentido de trealasa

El vector de expresión de RNA antisentido consta de una secuencia de 560 pb en versión antisentido (TREAs) proveniente del gen de la trealasa de alfalfa. El fragmento de 560 pb

corresponde a la región conservada entre los genes de trealasa de soya (*Glycine max*), papa (*Solanum tuberosum*), *Arabidopsis* y alfalfa (*Medicago sativa*). La expresión del antisentido esta regulada por el promotor constitutivo 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV). La efectividad de inhibición la secuencia antisentido fue evaluada obteniendo una disminución de la actividad trealasa del 49% para la versión 35S: TREas y del 57% para la versión rd29A: TREas (rd29A: promotor de *Arabidopsis* inducible por estrés) en plantas transgénicas de tabaco (Gamez et al. 2004). La selección de tejido transformado se desarrollo mediante el co-bombardero con el plásmido pWRG1515 (Christou et al. 1992), el cual contiene al gen reportero *uidA* y el gen *hptII* de resistencia a higromicina bajo el control del promotor 35S del CaMV (Fig. 8).

35S:TREas



pWRG-1515

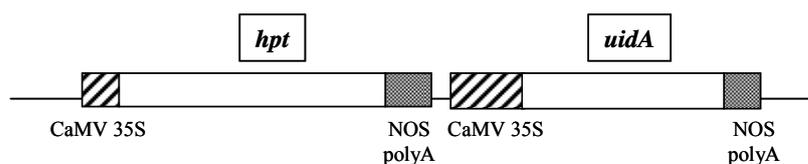


FIGURA 9. Esquema de casete de expresión de RNA antisentido y plásmido de selección. CaMV35S, región promotora 35S del Virus del mosaico de la coliflor; *nptII*, neomicina fosfotransferasa II; TREas fragmento antisentido de trealasa; NOS ter, terminador de nopalina sintetasa; BI, borde izquierdo; BD, borde derecho; *hptII*, higromicina fosfotransferasa; *uidA*, beta-glucuronidasa; NOS polyA, señal de poliadenilación de nopalina sintetasa.

6.2.2 Preparación de DNA

Se realizaron maxi-preparaciones de DNA mediante la técnica de acetato de amonio: se partió de un preinoculo de 2 ml para obtener un cultivo de 250 ml de la cepa de interés que se incubó de 12 a 16 hrs a 37°C a 200 rpm; después de este tiempo el paquete celular se obtuvo por centrifugación a 5000 rpm por 10 min. El paquete celular se resuspendió en 6ml de sol'n de resuspensión (50 mM glucosa, 25 mM Tris-Cl (pH 8.0), 10 mM EDTA (pH 8.0)) e incubó en hielo/20 min. Posteriormente se le adicionaron 12 ml de Sol'n de lisis celular (0.2 N NaOH, 1% SDS) y se mezcló por inversión manteniendo 5 min. Se agregaron 9 ml de acetato de amonio 7.5 p H 7.6, vórtex e incubó en hielo/10 min. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 8000 rpm durante 15 min. El sobrenadante fue recuperado y se le agregó 0.6 volúmenes de isopropanol frío e incubó 10 min a T° ambiente y nuevamente fue centrifugado. La pastilla obtenida fue resuspendida en 4 ml de acetato de amonio 2.0 M pH 7.4 e incubada 10 min en hielo, se centrifugó a 8000 rpm por 15 m para precipitar proteínas. El sobrenadante fue recuperado y se agregó 4 ml de Isopropanol frío e incubó 10 min a temperatura ambiente

y centrifugó nuevamente a 8000 rpm por 15 m. El precipitado resultante se resuspendió en 1 ml de agua bidestilada estéril y 5 μ l de RNasaA (10 mg ml⁻¹) e incubó a 37° C durante 20 min. Se agregó 1 ml de acetato de amonio 7.5 M pH 7.6, mezcló por inversión e incubó 5 min T° ambiente, posteriormente se centrifugó 8000 rpm por 15 min; el sobrenadante se precipitó con 3 ml de Isopropanol frío e incubó 10 min a T° amb y fue centrifugado a 10000 rpm durante 10 min. La pastilla resultante se lavó con 1 ml de etanol al 70% y secó a 60° C por 10 min; finalmente el DNA fue resuspendido en 200 μ l de TE 1X estéril (10 mM Tris-Cl, 0.1 mM EDTA pH 7.6).

6.3 Análisis de Funcionalidad de Secuencia Antisentido en Tabaco

El análisis de funcionalidad de semillas transgénicas se realizó evaluando el porcentaje de germinación y habilidad de crecimiento en condiciones de estrés osmótico. La resistencia a condiciones de alta osmolaridad se evaluó en base al número de semillas germinadas y el número de plántulas resistentes capaces de crecer en el medio selectivo.

6.3.1 Germinación de semillas transgénicas de tabaco en medios selectivos

Semillas T0 de las líneas transgénicas y control se desinfectaron *in vitro* a través del siguiente tratamiento: inmersión en 500 μ l de etanol al 70% durante 1 min, posteriormente en 1 ml de solución de hipoclorito de sodio al 20% durante 20 min adicionales, posteriormente se realizaron 5 lavados en agua destilada estéril. Las semillas fueron inoculadas para su germinación en placas de petri conteniendo el medio de crecimiento correspondiente e incubadas a temperatura ambiente bajo un fotoperíodo de 16 hrs luz/8 hrs oscuridad. Para realizar los ensayos de germinación se sembraron 100 semillas por placa de petri conteniendo los siguientes medios: medio selectivo kn (MS suplementado con 3% de sacarosa y 150 mgr/L de Kn); medio osmótico PEG (MS suplementado con 3% de sacarosa y 3% de PEG 8000) y medio osmótico con sacarosa (MS suplementado con 12% de sacarosa)

6.4 Manejo *in vitro* del Cultivo de Callo Embriogénico y Plántulas de Arroz

6.4.1 Desinfección de semillas de arroz

Las semillas desinfectadas superficialmente en etanol al 70% por 3 minutos, posteriormente en una solución hipoclorito de sodio al 5% durante 40 minutos con 0.2% de tween 20; posterior a este tratamiento se realizaron 5 a 6 lavados abundantes en agua destilada estéril donde fueron mantenidas hasta su siembra.

6.4.2 Inducción de callo embriogénico de arroz

La inducción de callo embriogénico se realizó siguiendo la metodología propuesta por Valdez et al. (1998). Las semillas esterilizadas se colocaron en medio de Inducción de callo embriogénico (MS suplementado con 3% de sacarosa, 2.5 mg L⁻¹ 2,4-D y 0.2% de gelrite) e incubadas en condiciones de oscuridad a 25° C durante 15 días. Para la transformación el callo embriogénico fue tomado directamente de la semilla y preparado para biobalística. Para

su propagación el callo generado fue disectado y mantenido por sub-cultivos periódicos en placas con medio fresco en condiciones de oscuridad.

6.4.3 Cinética de crecimiento de callo embriogénico

Se pesaron 100 mgr de callo embriogénico y colocaron en medio de inducción. Cada 7 días fué pesado el callo embriogénico durante cinco semanas consecutivas sub-cultivando cada vez a medio fresco. Las lecturas fueron hechas por triplicado en balanza semi-analítica.

6.4.4 Preparación de tejido para transformación y selección.

Una vez obtenido el callo embriogénico, se disectó el callo eliminando cualquier tejido no embriogénico. Aproximadamente 12 hrs antes del evento de transformación los explantes de callo embriogénico fueron sometidos a un tratamiento osmótico con el fin de aumentar eficiencia de transformación, fueron sub-cultivados a medio de inducción de callo suplementado con 12% de sacarosa. Después de 24 hrs post-bombardeo el callo fue sub-cultivado a medio de inducción durante 1 semana para permitir su recuperación.

6.4.5 Regeneración de plántulas a partir de callo embriogénico

Los callos embriogénicos fueron incubados a 28° C y bajo un fotoperíodo de 16 hrs luz/8 hrs oscuridad hasta la germinación de embriones. Los reguladores de crecimiento en solución fueron esterilizados por filtración y posteriormente añadidos al medio de cultivo estéril a una temperatura de 50° C. El callo sometido a regeneración fue colocado en placas de Petri y las plántulas obtenidas se mantuvieron en frascos de vidrio conteniendo medio MS suplementado con 1% de sacarosa bajo el mismo fotoperíodo.

6.4.6 Enraizamiento y aclimatación de plántulas regeneradas

Plántulas de aproximadamente 1 cm de longitud fueron sub-cultivadas a medio MS suplementado con 8% de sacarosa e incubadas a una temperatura de 28° C y un fotoperíodo de 16 hrs luz/8 hrs oscuridad hasta obtener raíces de aprox. 10 cms de long. Las plántulas obtenidas en estas condiciones se extrajeron de la placa de regeneración se lavaron en agua destilada estéril con el objeto de eliminar los residuos del medio de cultivo. Las plántulas fueron mantenidas en agua hasta ser sembradas en sustrato de mezcla estándar (tierra negra de monte y hoja de lama en proporción equivalente), en bolsa plástica de 10 litros de capacidad. La plantas de arroz fueron cultivadas en invernadero en condiciones de alta humedad (>85% HR) y un fotoperíodo de 16 hrs / 8 hr oscuridad. Las plantas de arroz se fertilizaron la fórmula 15:30:15 (N, P, K) de Ferviafol® preparado a 200 ppm hasta el fin del experimento.

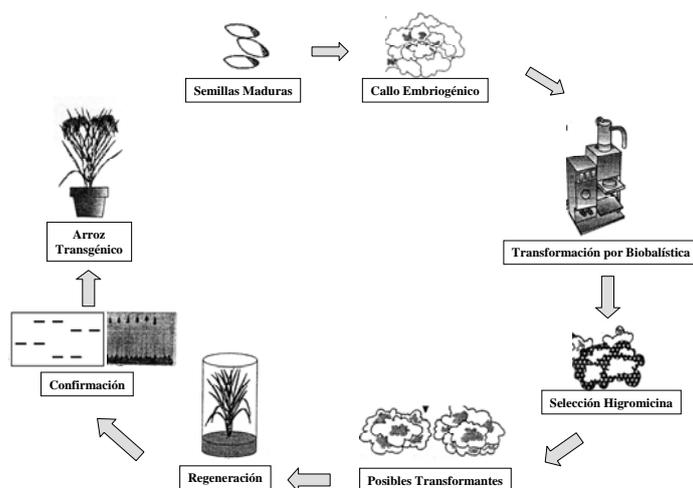


FIGURA 10. Metodología de la transformación genética por Biobalística.

6.5 Transformación de Callo Embriogénico de Arroz por Biobalística

La transformación de arroz se realizó por el método de biobalística con el sistema de bombardeo de DuPont Helium PDS-1000/He y la metodología propuesta por Valdez y cols. (1998) en arroz.

6.5.1 Preparación de micropartículas

La técnica de preparación de micropartículas que a continuación se describe es de acuerdo a Tomes et al. (1995) y modificado por Cabrera et al. (1997). Fueron pesadas 60 mgr de micropartículas de oro o tungsteno de 1μ de diámetro y colocadas en un tubo de vidrio de 20 ml. Se agregaron 2 ml de ácido nítrico 0.1 M y se sonicó a 4° C durante 20 min. Se centrifugó a 12000 rpm por 2 min y eliminó el ácido nítrico, posteriormente se agregó 1 ml de etanol absoluto y sonicó brevemente. Nuevamente se centrifugó a 10000 rpm por 30 seg, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1ml de agua desionizada por sonicación breve. Se realizaron alicuotas de 250 μ l y agregó adicionalmente 750 μ l de agua desionizada y almacenadas a -20° C, obteniendo una concentración final de 15 μ g/ μ l.

6.5.2 Preparación de micropartículas/DNA para bombardeo

En tubo de microcentrífuga se agregó 50 μ l de micropartículas de oro o tungsteno (15 mg/ml) previamente resuspendidas por sonicación, se adicionó sin mezclar 1 μ g de DNA, 50 μ l de CaCl 2.5 M y 20 μ l de espermidina base libre 0.1 M. La mezcla fue sonicada brevemente y centrifugada durante 20 segundos; posteriormente fue eliminado el sobrenadante y se agregó 400 μ l de etanol absoluto para realizar lavado, se resuspendió la mezcla por sonicación y centrifugó nuevamente. Una vez eliminado el sobrenadante la pastilla obtenida fue resuspendida por sonicación en 75 μ l de etanol absoluto. Para el bombardeo, se colocaron 10 μ l de la mezcla de partículas/DNA en la membrana acarreadora, utilizándose

finalmente 125 µg de micropartículas asociadas con 1.6 µg de DNA por disparo. Una vez evaporado la suspensión, se encontró listo para la realización del disparo.

6.5.3 Condiciones de bombardeo

Se utilizaron micropartículas de oro o tungsteno de manera indistinta preparadas como anteriormente se mencionó; una presión de 800 PSI, vacío de 20-22 pulgadas de Hg, una distancia de 10 cms. entre membrana y tejido blanco. La preparación y ensamblaje de membranas y piezas de la cámara, así como bombardeo se realizó siguiendo las recomendaciones del sistema de biobalística DuPont.

6.5.4. Selección de material transformado

La selección de callo transformado se realizó en el medio de inducción suplementado con 80 mg L⁻¹ de higromicina incubado en condiciones de oscuridad. Con subcultivos periódicos en el mismo medio hasta obtener callo creciendo activamente o apariencia vigorosa.

6.6 Caracterización de las Plantas Transgénicas

El material transformado resultante del proceso de selección en higromicina, fue analizado en primera instancia bioquímicamente a través de la actividad β-glucuronidasa del gen reportero en etapa de callo y posteriormente una vez generadas plántulas, éstas fueron analizadas por PCR.

6.6.1 Análisis de actividad β-glucuronidasa

El nivel de actividad del gen reportero se analizó en tejido con 3 días post-bombardeo y posteriormente en tejido ya seleccionado en higromicina para determinar la actividad proveniente de la expresión estable. Inicialmente se colocaron 500 µl una solución de X-GLUC en pozos de placa de ELISA, posteriormente se colocaron fragmentos de callo bombardeado y/o transformado e incubaron en la oscuridad a temperatura ambiente durante 12 hrs. Durante el tiempo de incubación y al final del mismo se realizaron observaciones a microscopio estereoscópico del nivel de actividad del gen reportero β-glucuronidasa observado por aparición de zonas localizadas de coloración azul. Posterior a la observación de la actividad, se eliminó el reactivo de los pozos, se lavó con etanol al 70% y almacenados en glicerol al 50%.

6.6.2 Análisis de transgén por PCR

Para la determinación de la presencia de los vectores de expresión transformados, se realizó una prueba de PCR específico para amplificar la secuencia de antisentido de trealasa y con ello determinar la presencia del transgén.

6.6.2.1 Extracción de DNA

La extracción de DNA se realizó a partir aproximadamente 50 mg de material liofilizado. Las muestras fueron calentadas a 95°C por 10 minutos en 300 µl de buffer TE 1X, posteriormente se le agregó 400 µl de buffer de lisis (2.5% CTAB, 1% NP40, 0.2% β-mercaptoetanol, 1.5 M NaCl, 25 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl pH 8) se incubó a 50° C durante 30 minutos. Posteriormente se centrifugaron a 14 000 rpm por 10 minutos; se recuperó el sobrenadante y se realizó un lavado con 1 volumen de fenol: SEVAG (24 cloroformo: 1 alcohol isoamílico) centrifugando nuevamente a 14000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante fue recuperado y precipitado con 2 volúmenes de alcohol al 95° a 4°C por 2 horas; se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos. La pastilla fue lavada en 1 ml de etanol al 70% y secada finalmente a temperatura ambiente. El DNA fue reconstituido en 100 µl de TE 1X y analizado en gel de agarosa al 0.8%.

6.6.2.2 Prueba de PCR

Una vez extraído el DNA total de las muestras de arroz, se procedió a realizar la prueba de PCR para el fragmento antisentido de trealasa. La reacción de PCR se realizó en un volumen de 50 µl utilizando 3 µl de DNA de arroz, 2 µl de cada oligonucleótido, 5 µl de buffer de reacción, 1 unidad de *Taq* polimerasa y aforado a 50 µl con H₂O mili-Q. Los oligonucleótidos utilizados fueron los siguientes: TRE 1: TATTACTGGGA TTCTT y TRE 2: TTGATTTAAATGCATTTCTACCCGGG. El programa utilizado se diseñó de la siguiente manera: paso 1: 94°C – 5 minutos, paso 2: 94°C -1 minuto, paso 3: 53°C - 2 minutos, paso 4: 72°C - 1 minuto, paso 5: 35 ciclos del paso 2 al 4, paso 6: 72°C - 5 minutos.

6.7 Análisis de Actividad Trealasa

Para determinar si la inhibición por antisentido del gen de la trealasa fue obtenida, se detectaran los niveles de actividad de la enzima en las plantas transgénicas creciendo en condiciones *in vitro*. Las plántulas creciendo en medio MS suplementado con 1% de sacarosa durante 15 días, posteriormente las plantas fueron colectadas y lavados en agua destilada; fraccionados en diferentes regiones en raíz, hoja y tallo. Se realizaron por triplicado las extracciones por planta analizada, a excepción de la raíz ya que fueron homogenizadas raíces de tres plantas en una misma extracción.

6.7.1 Preparación de Extracto Crudo de Proteínas

El extracto enzimático crudo se obtuvo mediante la maceración de tejido fresco en mortero en presencia de nitrógeno líquido con buffer de extracción MES (ácido 2-[N-Morpholino] etano sulfónico) 0.1 M pH 7 frío (5 ml). Posteriormente el extracto se centrifugó a 5000 rpm / 10 min a 4°C para obtener las proteínas extraídas en suspensión, al sobrenadante se le agregó 1 volumen de sulfato de amonio al 60% se incubó 30 min en hielo. Enseguida se centrifugó a 15000 rpm / 30 min; la pastilla se resuspendió en 600 µl de buffer MES 0.1M pH 6.0 almacenando el extracto a 4°C.

6.7.2 Cuantificación de proteínas

Para la determinación de la cantidad de proteína presente en el extracto enzimático crudo se utilizó el reactivo Protein Assay de Bio-Rad el cual se basa en el método de Bradford. Se realizaron diluciones de proteínas 1:10 en buffer MES 0.1 M pH 6.0 las cuales se incubaron con un volumen del reactivo arriba señalado, después de incubarlo con 5 min se realizaron las mediciones a 595 nm en placas de lector de ELISA (TECAN GENios) capturado con el programa XFLUOR4 Version V 4.5. La comparación con una curva de calibración con albúmina de suero bovino (BSA) permitió obtener los datos de concentración relativa de proteína presente en el extracto.

6.7.3 Reacción enzimática

Se tomaron 270 µl del extracto enzimático los cuales se incubaron 1hr a 37°C con 30µl de una solución 100 mM de trealosa pura (SIGMA). Transcurrido el tiempo de incubación se detuvo la reacción a 100°C /10min.

6.7.4 Cuantificación de Glucosa

Se procedió a realizar la lectura de glucosa liberada mediante el método enzimático-colorimétrico GOD-POD. Se tomaron 100 µl de la reacción de digestión e incubaron con 200 µl de una solución GOD-POD (SIGMA) preparada según las especificaciones del fabricante. La lectura de las muestras se realizó en un lector de placas de ELISA (TECAN GENios) a una absorbancia de 415 nm y capturado con el programa XFLUOR4 Versión V 4.5.

Para eliminar el error producido por la glucosa presente en el extracto, se cuantificó de igual manera y estos valores fueron restados a los obtenidos del ensayo de la actividad enzimática en presencia de trealosa. Los valores obtenidos de este ensayo muestran La actividad trealasa fue expresada como microgramos de glucosa liberada por miligramo de proteína por hora.

6.8 Análisis de Tolerancia a Estrés Abiótico

Para determinar los niveles de tolerancia a estrés abiótico conferidos mediante la inhibición por antisentido de la enzima trealasa, se realizaron ensayos en invernadero. A un grupo de 3 plantas de cada línea transgénica de 50-60 días de crecimiento, fue suspendida la administración de agua y colocadas en ambiente de menor humedad relativa (25-50 % HR.) en invernadero; el grupo control fue mantenido en condiciones de alta disponibilidad de agua y alta humedad relativa (> 85% HR.).

TRATAMIENTO DE SEQUIA

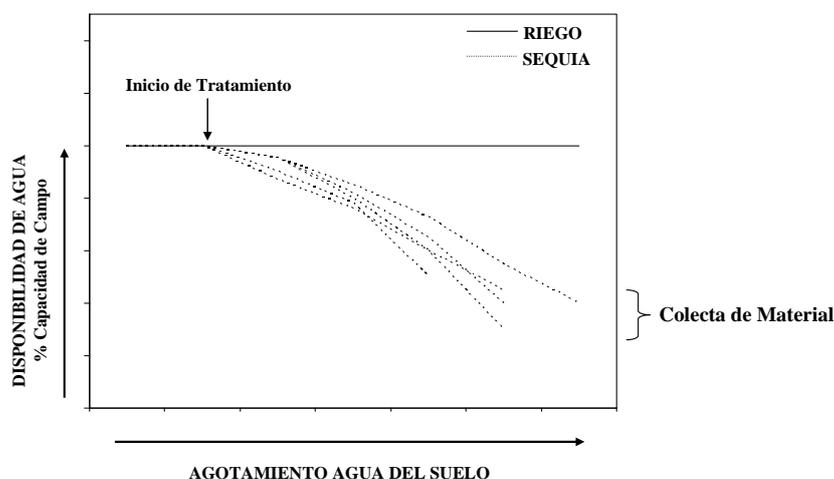


FIGURA 11. Gráfica de la pérdida de agua de suelo en plantas de arroz bajo tratamiento de sequía

6.8.1 Determinación del porcentaje de capacidad de campo (% CC)

Las plantas sometidas al tratamiento de estrés hídrico por la suspensión de riego fueron periódicamente analizadas para determinar la cinética de pérdida de agua de suelo. Para determinar el 100% de capacidad de campo de la mezcla utilizada, se regó a saturación una muestra de suelo, después de 24 hrs, se tomó la lectura del peso y posteriormente se secó en un horno a 60°C por 48 hrs y se determinó su peso seco; Por diferencia de pesos se calculó la cantidad de agua presente en este suelo a CC. Para las muestras de suelo problema, la cantidad de agua presente se expresó en % de CC en base al valor de referencia según la relación:

$$\% \text{ CC} = \frac{\text{gr H}_2\text{O presente en suelo problema} (100 \% \text{ CC})}{\text{gr H}_2\text{O presente en suelo a CRC.}}$$

De esta forma las macetas conteniendo las plantas sometidas a estrés hídrico fueron periódicamente pesadas para determinar el % de CC y determinar el momento de procesarlas.

6.8.2 Determinación del contenido relativo de agua (CRA)

Con un sacabocado de un diámetro de 0.5 cms., se tomaron tres muestras de hoja, las cuales fueron conservadas en hielo en tubos de microcentrífuga hasta su procesamiento. Primeramente se leyó el peso fresco (PF) de las porciones de hoja, se le agregó agua destilada e incubaron durante 12 hrs. Luego se determinó el peso túrgido (PT) eliminando el exceso de agua en papel secante; después de ser colocados en horno a 60°C durante 24 horas se determinó el peso seco (PS). Con estos datos se calculó el contenido relativo de agua (CRA) según la fórmula:

$$\text{CRA} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PT} - \text{PS}}$$

6.8.3 Determinación de actividad fotosintética

La lectura de fotosíntesis se realizó utilizando el sistema cerrado de medición portátil (Portadle Photosynthesis System LI-COR, Inc. Modelo LI-6200), las lecturas se realizaron en cámaras de 200 cc. siguiendo las especificaciones del fabricante. Anterior a la lectura de fotosíntesis las plantas mantenidas en condiciones de invernadero fueron aclimatadas por 20 minutos a una intensidad de luz de $1000 \mu\text{mol m}^2 \text{s}^{-1}$ proporcionada por una lámpara de 1000 w filtrados a través de una capa de agua de 5 cm contenida en una caja plexiglas. Las lecturas se realizaron en hojas maduras fotosintéticamente activas o aquellas que reflejaran el fenotipo general de la planta.

6.9 Análisis del Contenido de Carbohidratos de Raíz

El análisis de carbohidratos se realizó mediante Cromatografía de Gases (HP 6850) de raíces de plantas de arroz liofilizado proveniente del ensayo de tolerancia a estrés hídrico realizado en condiciones de invernadero.

6.9.1 Colecta y almacenamiento de material vegetal

El material colectado en invernadero congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -20°C ; separando el área foliar de las raíces. Posteriormente este material fue liofilizado a una temperatura de -40°C con una presión de vacío de 0.005 mm Hg durante 48 horas. Las raíces liofilizadas se limpiaron de restos de suelo y fueron molidas hasta obtener un polvo de grano medio a fino, este material se almacenó a temperatura ambiente.

6.9.2 Extracción de carbohidratos

Se tomaron 100 mgr del polvo de raíz molida para la extracción en 10 ml de Etanol al 80 % macerando en mortero. La mezcla fue colocada en tubo de ensayo de 50 ml e incubados a $90^{\circ}\text{C}/30 \text{ min}$, dejando enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente se centrifugaron la mezcla a 15000 rpm/15 min para precipitar el material insoluble conteniendo almidón; el sobrenadante se colectó en un tubo nuevo repitiendo la extracción a la pastilla resultante dos veces más. Los 30 ml resultantes fueron concentrados a 1 ml en un evaporador rotatorio (Labotec) a 60°C , transferido a un tubo eppendorf y almacenados a 4°C , para ser analizado el contenido de trealosa y otros azúcares por GC-MS. El material proveniente de la fracción insoluble fue secado en horno a 65°C obteniendo una pastilla conteniendo almidón.

6.9.3 Análisis y cuantificación de carbohidratos solubles

Para el análisis del contenido de trealosa por GC-MS se realizó previamente el proceso de derivatización de azúcares de la fracción soluble. La derivatización consiste en una modificación química de extremos reductores y no reductores por la adición de grupos acetilo y amino.

6.9.3.1 Derivatización.

Se tomaron 100 μl del extracto de carbohidratos, 25 μg de perseitol como estándar interno fueron evaporados a 60°C en un rectivial, lavados y evaporados 3 veces con 1 ml de diclorometano a 60°C . A los extractos secos fueron añadidos 1.5 ml de piridoxina

conteniendo 26.5 mg de cloruro de hidroxilamina. Los viales se cerraron y sonicaron durante 30 min. e incubados a 85°C durante una hora, posteriormente las reacciones fueron enfriadas a temperatura ambiente e incubados nuevamente a 85° C por 30 min. después de añadirle 500 µl de piridina y 1 ml. de ácido anhídrico. La reacción fue vaciada en tubos de ensayo y lavado con 3 ml. de cloroformo, se agregó 5 ml de H₂O desionizada mezclado en vórtex y reposado para permitir la separación de las fases, posteriormente la fase superior acuosa se retiró con micropipeta y se desechó en contenedor específico. De esta forma se realizaron lavados con agua desionizada de 6 a 8 veces según la pureza obtenida de la fase acuosa. La fase de cloroformo se vació a una columna de sulfato de sodio anhidro la cual fue lavada con 2 ml adicionales de cloroformo; la muestra fue colectada en envases de vidrio de 1 ml, evaporadas en un plancha a 70° C y resuspendidas finamente en 100 µl de cloroformo grado espectrofotometría y almacenados a temperatura ambiente.

6.9.3.2 Identificación por GC-MS

La identificación de los azúcares derivatizados se realizaron a través de un Cromatógrafo de Gases (HP 6850) equipado con un Detector de Masas (HP 5973) y una columna HP-5MS (Hewlett-Packard) utilizando Helio como gas acarreador. Las condiciones de operación fueron las siguientes: Inyector y Detector 300° C, temperatura de horno 150° C por 3 min, elevación de 6° C min⁻¹ hasta 270° C y mantenido por 15 minutos, y finalmente elevación a 300° C por 3 min. Los datos de Cromatograma obtenidos fueron analizados con el programa GC/MSD ChemStation Software (Agilent Technologies).

6.9.4 Análisis del Contenido de Almidón

El análisis de almidón se realizó mediante la digestión con α -amilasa según la metodología propuesta por Smith y Zeeman (2006) y el contenido de glucosa resultante mediante la técnica enzimática colorimétrica con conjugado GOD-POD.

6.9.4.1. Digestión de almidón

Una fracción de la muestra conteniendo almidón fue pesado y homogenizado con ayuda de un pistilo en 500 µl de agua en tubos eppendorf de 1.5 ml, y posteriormente calentados a 100°C durante 10 minutos. Una vez frío se le añadió 500 µl de acetato de sodio 200 mM pH 5.5 como buffer de reacción y 0.5 U de α -amilasa, la reacción fue incubada por espacio de 4 hrs a 37°C. Para su análisis, las muestras se centrifugaron a 14 000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. La cuantificación enzimática de la glucosa liberada se realizó como ya específico anteriormente

6.10. Análisis Estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó con el programa SPSS versión 17.0 Statistics. Utilizando como modelo estadístico el análisis de varianza (ANOVA), considerando el nivel de significancia de 0.05. Los resultados mostrados se analizaron a partir de 3 plantas para cada planta control y líneas transgénicas.

RESULTADOS

7.1 Análisis de la funcionalidad de secuencia Antisentido en Tabaco

La evaluación de la funcionalidad de secuencia antisentido dirigida a inhibir la expresión del gen de la trealasa, se realizó evaluando la germinación y viabilidad *in vitro* de semillas T0 de tabaco en condiciones de alta concentración de azúcares (12% de sacarosa) y estrés osmótico (simulado con 3% de PEG 8,000). Las plántulas viables se contabilizaron 25 días posteriores a la siembra y los resultados muestran la viabilidad de líneas representativas, como control se germinaron en medio MS. En medio MS suplementado con 12% de sacarosa el porcentaje de plántulas viables constituyó el 65% del total de semillas sembradas para la línea 35S: TREas; en la línea rd29: TREas se obtuvo el 97% de plántulas viables. En medio MS suplementado con 3% de PEG se alcanzaron porcentajes de viabilidad similares para ambas líneas (alrededor del 91 %) (Figura 12). Un reducido porcentaje de semillas no transformadas (w.t) lograron germinar, sin embargo no fueron capaces de sobrevivir, presentando clorosis en las hojas, vitrificación y finalmente cese del crecimiento, sin presentar desarrollo de hojas primarias ni raíz en ambas condiciones selectivas.

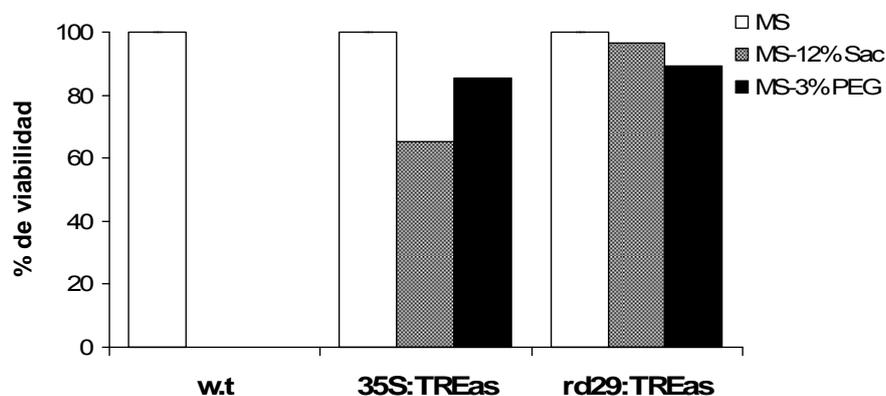


FIGURA 12. Análisis de Funcionalidad de secuencia antisentido en Tabaco. Porcentajes de sobrevivencia de plántulas de tabaco silvestres (w.t.) y líneas transgénicas, 25 días posterior a ser germinadas *in vitro* en medio control y osmóticos.

El fenotipo de las plántulas transgénicas germinando en los medios osmóticos varió significativamente de las semillas w.t (Figura 13). Plántulas transgénicas creciendo en medio suplementado con 12 % sacarosa fueron capaces de desarrollar raíz y hojas primarias en contraparte de las plántulas w.t. cuyas plántulas cesaron el crecimiento inmediatamente

después de germinar. Es importante recalcar la diferencia fenotípica entre plántulas 35S: TREas y rd29: TREas, plántulas de la línea rd29: TREas desarrollaron un sistema radical más extenso y las hojas presentaron mayor área foliar; este fenotipo a su vez concordó con el mayor índice de plántulas resistentes. En medio suplementado con 3% de PEG no se observaron diferencias visibles entre ambas líneas, sin embargo el sistema radicular de la línea rd29: TREas mostraron un desarrollo abundante de raíz con numerosas raíces secundarias.



FIGURA 13. Fenotipos resistentes de plántulas de tabaco germinadas *in vitro* en medios osmóticos. Las imágenes corresponden a plántulas representativa de semillas no transformadas (w.t.) así como líneas 35S: TREas y rd29: TREas.

7.2. Manejo *in vitro* de Tejido Embriogénico y Plántulas de Arroz

7.2.1 Inducción de callo embriogénico y transformación

El proceso de generación de callo embriogénico comenzó con la germinación de embriones maduros y a partir de este tejido se generó el callo embriogénico en medio MS suplementado con 2.5 mg L⁻¹ de 2,4-D. El porcentaje de germinación e inducción de tejido embriogénico a partir de la región del escutelo fue del 100% para ambos genotipos. El aspecto del callo embriogénico obtenido inicialmente se observó como una estructura globular amarillenta de consistencia firme, compuesta principalmente de embriones en etapa globular (Fig. 14 a y b). El aspecto general del callo inducido fue muy similar para ambos genotipos,

sólo diferenciándose por el tamaño de la estructura generada y la tasa de división. Posterior a un periodo de inducción de 15 días, el callo fue disectado de la semilla y colocado en medio osmótico para su transformación por biobalística (Fig. 14-c). En un experimento independiente y con el fin de determinar la tasa de división, se realizó una cinética de crecimiento, donde se observó que existe una mayor tasa de división en el genotipo Morelos A98 cuando se compara con el genotipo Temporalero A95 (ver Fig. 14 d).

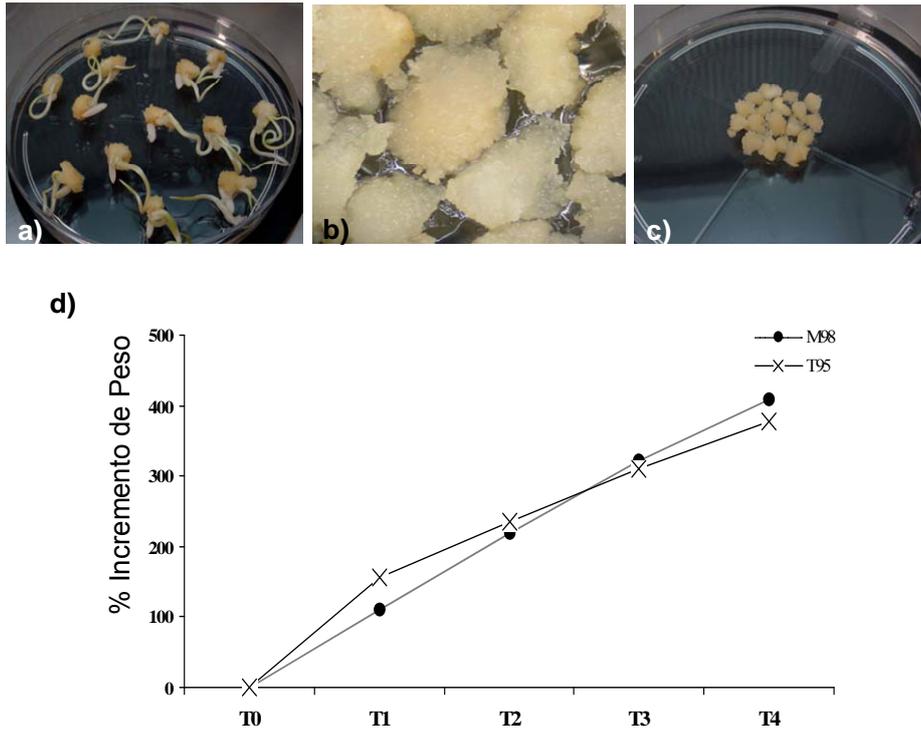


FIGURA 14. Cultivo de callo embriogénico de arroz. a) Generación de callo embriogénico a partir semilla después de 15 días de incubación; b) Aspecto general del callo embriogénico obtenido, obsérvese los embriones de apariencia globular; c) Embriones disectados y preparados para el bombardeo; d) Cinética de crecimiento del cultivo embriogénico.

La introducción del plásmido pBI: TREas conteniendo la secuencia antisentido bajo el promotor 35S CaMV (35S: TREas) en tejido embriogénico, se realizó por co-bombardeo del plásmido pWRG-1515 conteniendo el gen de selección para la resistencia a Higromicina en relación de 1:5 (pWRG-1515: pBI: TREas), utilizando para ello micropartículas de oro y tungsteno (Figura 15). El proceso de selección se realizó en medio de inducción suplementado con higromicina realizando sub-cultivos periódicos cada cuatro semanas a medio selectivo nuevo. Las líneas de callo embriogénico transformado, se seleccionaron disectando el tejido creciendo de manera activa del resto, proceso durante el cual se observaron marcadas diferencias entre los genotipos (Figura 16). La selección de tejido transformado en el genotipo Morelos A98 fue fácilmente distinguible por su consistencia y crecimiento activo claramente diferenciado de tejido sensible a higromicina (Figura 16 b). El proceso de selección en

Temporalero A95 fue caracterizado por la aparición de pequeñas zonas de tejido embriogénico de aspecto vigoroso pero de lento crecimiento paulatinamente diferenciándose del resto de tejido no transformado (Figura 16 c).

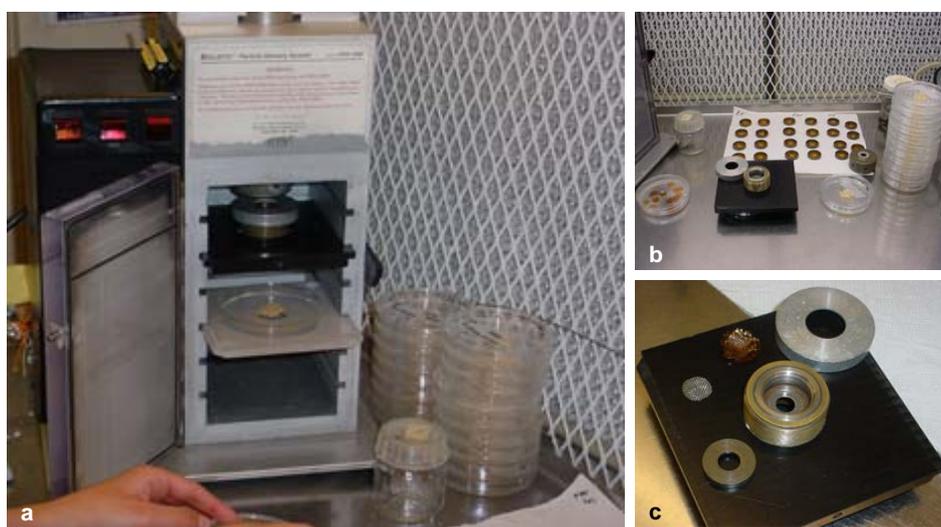


FIGURA 15. Sistema de transformación por biobalística. a) Pistola PSD-1000 de Du-Pont. **b)** Preparación de membranas acarreadoras y membranas de ruptura. **c)** Componentes del sistema de transformación posterior del bombardeo.

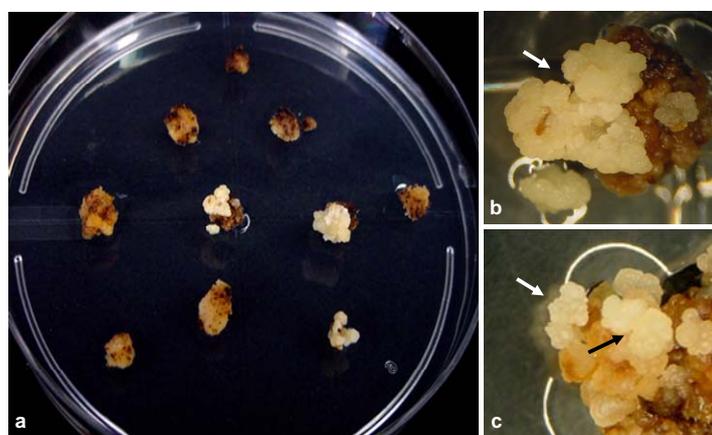


FIGURA 16. Proceso de selección de tejido transformado. a) Aspecto de cultivo de callo embriogénico en selección en medio MIC-hyg con la aparición de clones resistentes; **b)** Aparición de clona en la variedad Morelos A98; **c)** Aparición de clones discretas en callo de la variedad Temporalero A95.

Análisis detallado del proceso de transformación en base al número de callos bombardeados y la cantidad de líneas obtenidas en medio selectivo para cada genotipo,

mostró que en el genotipo Morelos A98 se obtuvo una eficiencia de transformación del 6%, en tanto que el genotipo Temporalero A95 mostró una eficiencia del 10% (Tabla 3). Asimismo se observó que la mayor cantidad de líneas y por lo tanto mayor eficiencia de transformación se obtuvo cuando el tejido se bombardeó con micropartículas de oro (1 μ m) dado que se obtuvieron aproximadamente el 80% de las líneas utilizando este material independientemente del genotipo.

Tabla 3. Evaluación del proceso de transformación genética mediante biobalística en arroz.

Genotipo	Callos Bombardeados	Clonas Resistentes		Clonas por Placa	Eficiencia de Transformación
		Au	M10		
Morelos A98	525	26	3	0.89	6 %
Temporalero A95	420	33	7	1.90	10 %

7.2.2 Análisis de actividad β -glucoronidasa

La evaluación de la actividad del gen reportero de β -glucoronidasa se realizó 3 días posteriores al evento de transformación, seleccionando al azar fragmentos de tejido bombardeado. Entre los genotipos se observó distinto nivel de actividad del gen β -glucoronidasa; en Morelos A98 la expresión transitoria fue alta localizando de 75 a 71 focos por callo en tanto para el genotipo Temporalero A95 fueron significativamente menor el número de focos de actividad (~20 focos por callo) (Tabla 4). El monitoreo de la expresión 60 días posterior al evento de transformación mostró un comportamiento similar entre los genotipos en un rango del 25 al 30% de expresión en tejido de nuevo crecimiento (en proceso de selección o finalizado) en medio selectivo. Sin embargo al analizar la actividad β -glucoronidasa al final del proceso de selección (alrededor de los 90 días post-bombardeo); las líneas derivadas de Morelos A98 perdieron la actividad en tanto que la Temporalero A95 conservó la actividad con la tinción de callo completo en esta etapa (ver Tabla 4 y Figura 17).

Tabla 4. Análisis del comportamiento de la actividad del gen reportero *uidA* (β -Glucoronidasa).

Genotipo	3 días Post-bombardeo # focos /callo	60 días post-bombardeo ⁽¹⁾	90 días post- bombardeo ⁽²⁾
Morelos A98	27 \pm 10	25 %	-
Temporalero A95	17 \pm 7	30 %	+

⁽¹⁾ Porcentaje de callos con expresión de β -glucoronidasa

⁽²⁾ Actividad β -glucoronidasa en clonas obtenidas durante el proceso de selección

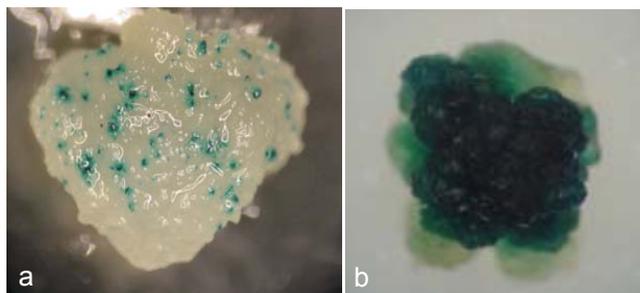


FIGURA 17. Actividad *in vivo* del gen reportero *uidA* (β -glucuronidasa) en callo embriogénico de arroz. a) Expresión transitoria: tinción en puntos localizados post-bombardeo; b) Expresión estable observada con la tinción de callo completo.

7.2.3 Regeneración de plántulas de arroz

Cultivos embriogénicos resistentes a Higromicina resultante del proceso de selección fueron propagados con el fin de obtener tejido suficiente para la etapa de regeneración. El medio de regeneración (MS suplementado con 3% sacarosa, 2 mg L⁻¹ BAP y 0.5 mg L⁻¹ ANA) reportado para el genotipo Morelos A92 (Martínez et al. 2003) no indujo regeneración en callos de ningún genotipo después de 30 días con un foto período de 16 hrs. luz/ 8 oscuridad. Callo embriogénico expuesto a estas condiciones presentó un alto índice de muerte celular, por lo que fue necesario estandarizar nuevamente el medio de regeneración con reguladores de crecimiento apropiados. Los primeros medios analizados consistieron de variaciones del medio MS básico y la fuente de carbón disponible: MS suplementado con 3% sacarosa, MS suplementado con 3% glucosa, 50% MS suplementado con 1.5% sacarosa y 50% MS suplementado con 1.5% glucosa. Las respuestas que se observaron fueron desde tejido necrosado, formación de raíces e inducción de la maduración de embriones. En el medio de crecimiento consistiendo de 50% MS suplementado con 1.5% sacarosa la maduración de embriones se observó en menos en el 10% del callo por lo que fue seleccionado como medio base de regeneración. Una vez seleccionado el medio base se procedió a realizar el análisis de los reguladores de crecimiento con el fin de maximizar la respuesta del callo.

Se analizaron los siguientes reguladores de crecimiento: 1.- Citocininas: bencilaminopurina, floroglucinol, difenilurea, adenina A, 2-isopentil adenina, cinetina y zeatina; y 2.- Giberelinas: ácido giberélico. El efecto de la adición de los reguladores de crecimiento se resume en la Tabla 5. La bencilaminopurina fue el regulador que más respuesta desarrolló en el genotipo Morelos A98, donde fue capaz de inducir la regeneración a una concentración de 2 mg L⁻¹. El genotipo Temporalero A95 respondió solo a una concentración de 10 mg L⁻¹ de bencilaminopurina induciendo el rápido desarrollo del área foliar sin elongación de la radícula. La difenilurea regeneró plántulas a las concentraciones de 0.02 y 0.2 mg L⁻¹ en Temporalero A95 y no así en Morelos A98; mismo efecto observado con el uso de 2-isopentil-adenina a las concentraciones de 0.1 a 1 mg L⁻¹. En ambos genotipos, la Cinetina mostró un amplio efecto al inducir la maduración de embriones en mayor eficiencia conforme se incrementó la concentración (de 0.05 a 5 mg L⁻¹). La zeatina indujo regeneración

sólo en el genotipo Morelos A98 a la concentración de 5 mg L⁻¹. Los reguladores adenina y floroglucinol no fueron capaces de inducir una respuesta y al contrario resultaron ser tóxicos a las concentraciones utilizadas en el caso del floroglucinol.

Tabla 5. Respuesta del callo embriogénico a la aplicación de los diferentes reguladores de crecimiento en la fase de regeneración a plántulas.

Regulador	Concentración [mg L ⁻¹]	Respuesta	
		Morelos A98	Temporalero A95
Acido Giberélico	0.001	-	-
	0.01	-	-
	0.1	-	-
Adenina	10	-	-
	40	-	-
2 isopentil adenina	0.1	md	md
	0.5	md	Plt
	1	md	Plt
Bencilaminopurina	5	md, ox	ox, md
	1	-	-
	2	Plt	-
	5	mde	md
Cinetina	10	mde	plt
	0.05	md	plt
	0.1	md	plt
	1	md	Plt
	5	plt	plt
Floroglucinol^a	0.5	-	-
	5	nec	nec
Difenil-urea	0.02	md	Plt
	0.2	md	Plt
	2	-	md
Zeatina	1	md	-
	5	Plt	-
	10	md	-

^a , concentración en mM. *Plt* = plántulas, *md*= maduración de embriones, *ox* = oxidación, *nec* = necrosis.

La respuesta morfogénica fue similar en todos los reguladores de crecimiento (a excepción de la cinetina), la germinación de embriones inició con el cambio de coloración del callo embriogénico de amarillo a verde, desarrollo del área foliar en primera instancia y posterior desarrollo de radícula. En presencia de cinetina se observó la germinación de embriones con desarrollo del área foliar y elongación de la radícula simultáneamente (Figura 18).

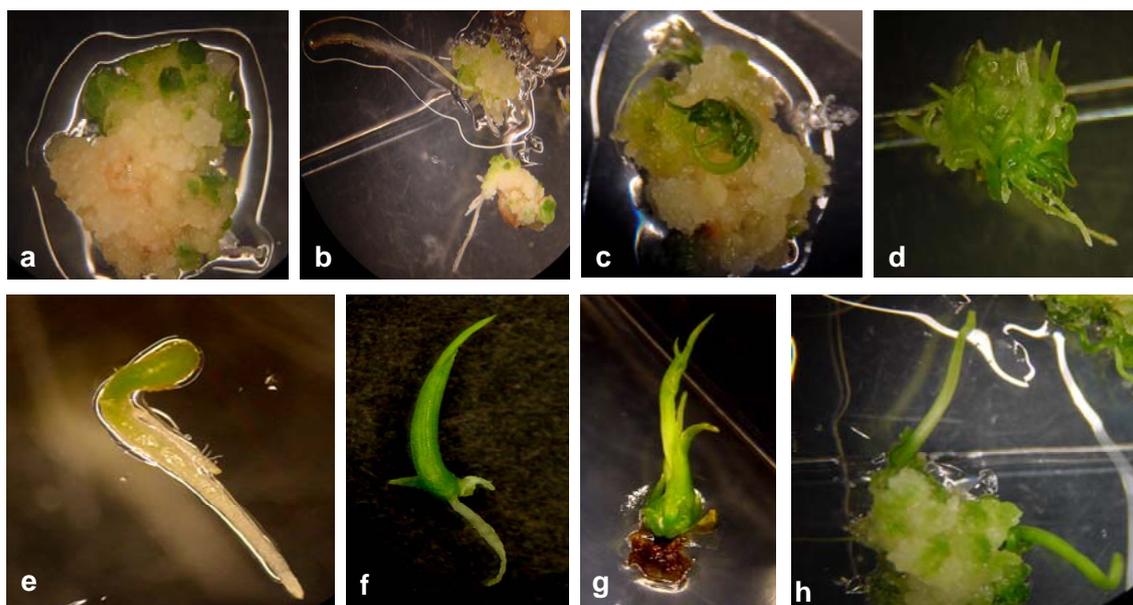


FIGURA 18. Respuestas morfológicas de callos embriogénicos de arroz en proceso de regeneración de plántulas. a) Callo sin respuesta; b) formación de raíces, c) maduración de embriones; d) obtención de plántulas; e) embrión germinado, puede observarse la radícula y primordio foliar; f) plántula obtenida de la germinación de un embrión somático, se observa raíz y primeras hojas; g) plántula obtenida vía organogénesis; h) elongación de primordio foliar

La selección del regulador de crecimiento utilizado para ambos genotipos se basó en el tiempo de respuesta, la germinación de embriones, porcentaje de respuesta y vigorosidad de las plántulas generadas. Para ambos genotipos, las condiciones de regeneración que mostraron mejor respuesta fueron 0.5 de MS suplementado con 1.5 % de sacarosa y 5mg L⁻¹ de cinetina. En la regeneración de líneas transgénicas se obtuvo una eficiencia de regeneración de 50% en el genotipo Morelos A98 y un 13% de regeneración en Temporalero A95. (Ver Tabla 6). Adicionalmente, el callo embriogénico fue secado durante 48 hrs. en oscuridad antes de ser colocado en el medio de regeneración con la finalidad de maximizar el proceso al aumentar el número de plántulas por callo (datos no mostrados).

Tabla 6. Eficiencia del uso de Reguladores de Crecimiento

Genotipo	Reguladores de crecimiento		Porcentajes de regeneración
	Inducción	Regeneración	
Morelos A98	BAP 2mg L ⁻¹	KIN 5mg L ⁻¹	50 %
	ZEA 5mg L ⁻¹		
	KIN 5mg L ⁻¹		
Temporalero A95	DPU 0.2mg L ⁻¹	KIN 5mg L ⁻¹	12.9 %
	BAP 2mg L ⁻¹		
	KIN 5mg L ⁻¹		

BAP (bencilaminopurina), KIN (Cinetina), DFU (Difenil-urea), y ZEA (Zeatina).

7.3 Micropropagación y Cultivo de Arroz en Invernadero

Se observó que plántulas provenientes de cultivo de regeneración murieron al ser colocadas directamente en medio de micropropagación. Por lo anterior, plántulas de 2 a 3 cm obtenidas del proceso de regeneración se sub-cultivaron a MS suplementado con 1% de sacarosa, con el fin de obtener plántulas de mayor vigor y una vez obtenidas plántulas vigorosas se sometieron al proceso de micropropagación. Se realizaron explantes de aprox. 1 cm a partir de la base del callo eliminando la raíz, fueron colocados en medio de propagación que consistió de MS suplementado con 3% sacarosa y 2mg L^{-1} bencilaminopurina, tales condiciones fueron previamente estandarizadas con el fin de evitar lo posible la formación de raíz y así obtener hijuelos de tamaño uniforme, con lo que se obtuvo de 10 a 20 hijuelos por explante (Figura 19).

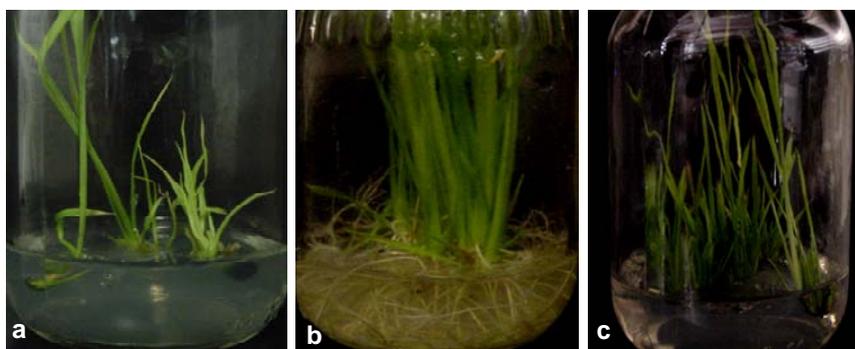


FIGURA 19. Cultivo *in vitro* de plantas de Arroz. a) Plantas creciendo en medio MS con sacarosa al 1%; b) Desarrollo de raíces en medio MS suplementado con sacarosa al 8%; c) Micropropagación en medio MS suplementado con 3% de sacarosa y 2mg L^{-1} de bencilaminopurina.

Plántulas de tamaño uniforme fueron sub-cultivadas en medio de enraizamiento que consistió de MS suplementado con 8% de sacarosa, en estas condiciones se indujo la formación de raíces. Plantas con raíces de tamaño suficiente (aproximadamente 10 cms) fueron transplantadas a suelo y mantenidas en invernadero. Para la realización del ensayo de tolerancia a sequía, fueron seleccionadas plántulas con igual número de hojas y similar longitud de raíz, transplantadas a suelo y mantenidas en invernadero hasta la realización de los ensayos (Figura 20).

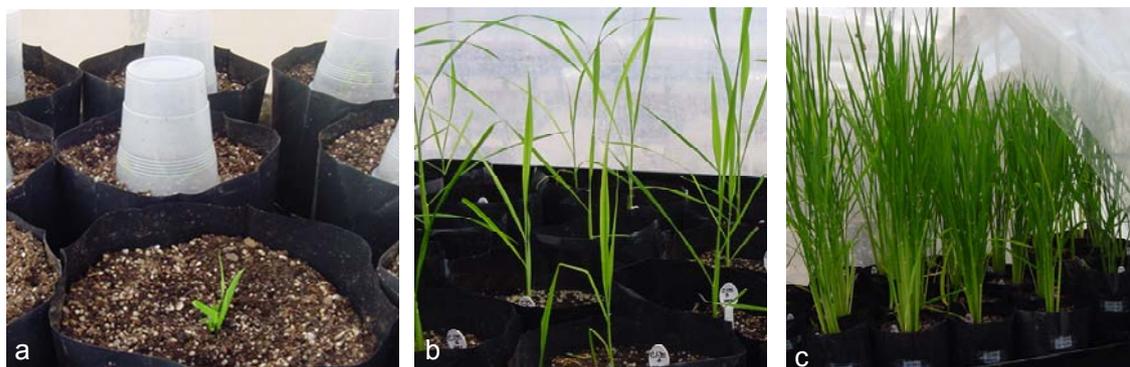


FIGURA 20. Cultivo de arroz en invernadero. a) Aclimatación de plántulas a suelo; b) Plantas en etapa vegetativa; c) Plantas de 2-3 meses en el inicio de etapa reproductiva.

7.4 Detección del Transgén en plantas transformadas

Plantas de arroz resultantes del proceso de regeneración fueron analizadas por la técnica de PCR para corroborar la presencia del fragmento antisentido de trealasa en las líneas de arroz. En las líneas analizadas fue posible amplificar un fragmento de 350 pb correspondiente a una región interna de la secuencia utilizada como antisentido. En la Figura 21 se observa los productos de amplificación resultantes de la reacción de PCR analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1%. DNA proveniente de plantas silvestres Morelos A98 y Temporalero A95, fueron utilizadas como controles negativos. La obtención de bandas de amplificación indica la naturaleza transgénica de las plantas analizadas de ambas genotipos.

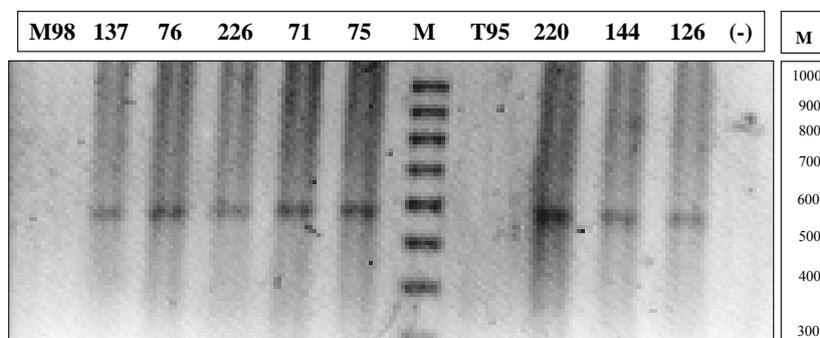


FIGURA 21. Detección de fragmento antisentido de trealasa por PCR en plantas de arroz. Productos de amplificación de transgén en líneas transformantes 137, 76, 226, 71 y 75 de la variedad Morelos A98 y de las líneas 220, 144 y 126 de la variedad Temporalero A95. **M98:** Morelos A98 tipo silvestre; **T95:** Temporalero A95 tipo silvestre; **M,** marcador de peso molecular 100 pbs Maxim Biotech; **(-),** Control negativo de reacción.

7.5 Análisis de Actividad Trealasa

Para determinar si la inhibición por antisentido del gen de la trealasa inhibió la expresión de ésta, se analizaron los niveles de actividad de la enzima en las líneas transgénicas creciendo en condiciones *in vitro*.

7.5.1 Actividad enzimática en plantas tipo silvestre

El análisis de actividad trealasa de plantas silvestres de Morelos A98 y Temporalero A95 creciendo en condiciones *in vitro* permitió observar que existen diferencias de los niveles de actividad entre los dos genotipos y en los distintos tejidos de la planta (hoja, tallo y raíz). En forma general se observó mayor actividad trealasa en todos los tejidos en el genotipo Temporalero A95, especialmente en raíz. El análisis completo de la actividad trealasa, mostró bajo niveles de actividad en hoja con valores de 0.017 y 0.049 $\mu\text{gr de Glu mgr Prot}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ para Morelos A98 y Temporalero A95 respectivamente. En tallo con valores de 0.04-0.06 $\mu\text{gr de Glu mgr Prot}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ para Morelos A98 y Temporalero A95 respectivamente. La actividad trealasa de raíz solo pudo ser detectada en el genotipo Temporalero A95 con valores cercanos a 0.1 $\mu\text{gr de Glu mgr Prot}^{-1} \text{ hr}^{-1}$, en el genotipo Morelos A98 no fue posible detectarla actividad hidrolítica (Figura 22).

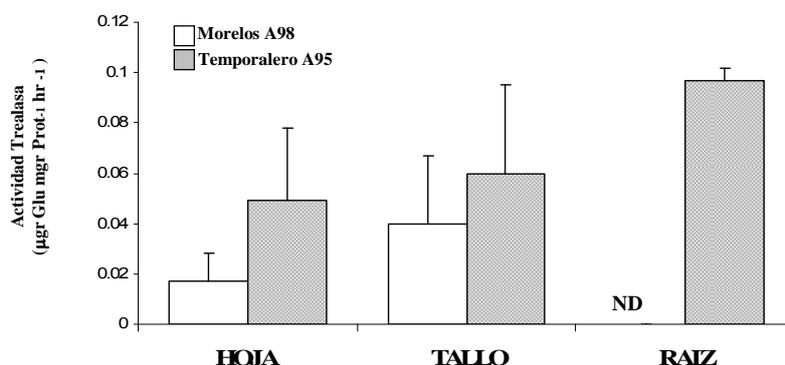


FIGURA 22. Actividad trealasa en arroz. Niveles de actividad Trealasa en $\mu\text{gr de Glu mgr Prot}^{-1} \text{ hr}^{-1}$ de hoja, tallo y raíz de plantas control mantenidas bajo condiciones de cultivo *in vitro*. ND, No Detectada.

7.5.2 Actividad enzimática de líneas transgénicas derivadas del genotipo Morelos A98

Líneas generadas del genotipo Morelos A98 mostraron disminución significativa de actividad Trealasa en hoja un rango 100 al 59% (clona 137 y 76 respectivamente), dos permanecieron sin variación significativa (226 y 75) y una mostró un incremento del 150% respecto a plantas tipo silvestre. Los porcentajes de disminución de actividad en tallo se encontraron en un rango de 19 a 67% para todas las líneas. Nuevamente no se detectó actividad trealasa en raíces de las líneas transgénicas a excepción de las líneas 71 y 75 donde se determinó que la actividad trealasa se encontraba presente con valores de 0.013 y 0.02 μgr

de Glu mgr Prot⁻¹ hr⁻¹. De esta forma se puede agrupar las líneas 137, 76 y 226 con disminución de actividad trealasa en hoja y tallo en diferente magnitud respecto a la planta silvestre (ver Figura 23); mayor porcentaje de disminución para la clona 137 (100% en raíz y 44% en tallo). Y en otro grupo las líneas 71 y 75 con disminución de actividad trealasa en tallo de alrededor del 50% (con distintos niveles actividad para hoja) pero con la presencia de actividad trealasa en raíz.

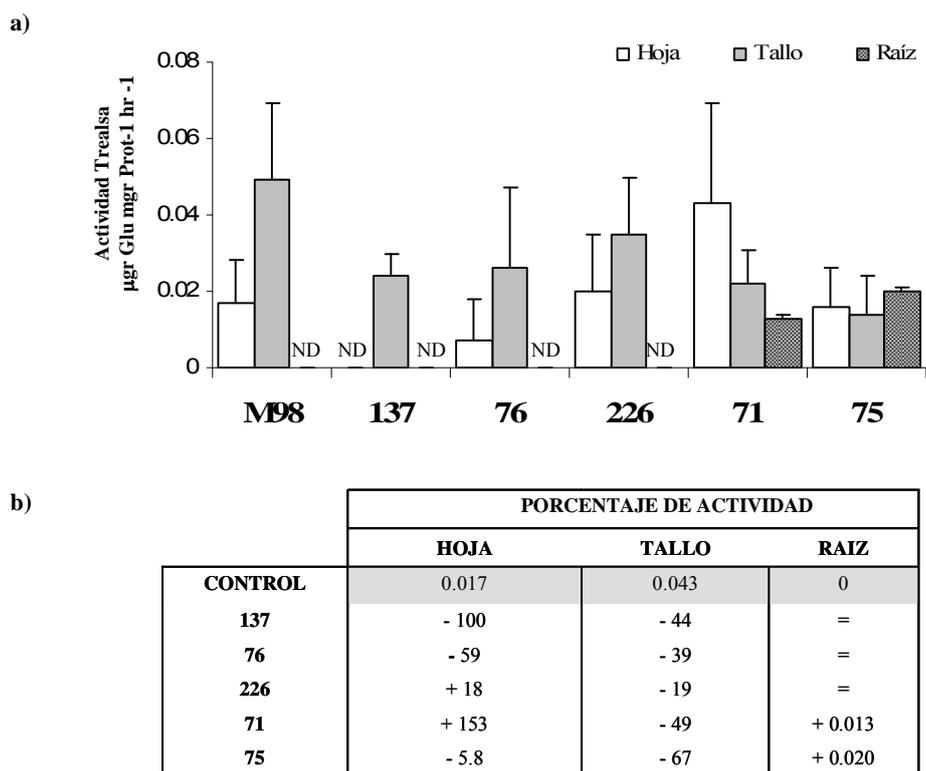


FIGURA 23. Actividad trealasa plantas transgénicas del genotipo Morelos A98. a) Niveles de actividad trealasa en µgr de Glu mgr Prot⁻¹ hr⁻¹ en hoja, tallo y raíz de plantas control y transgénicas mantenidas bajo condiciones de cultivo *in vitro*; **b)** Cuadro comparativo de los porcentajes de actividad trealasa respecto al control. ND, No detectada

7.5.3 Actividad enzimática en líneas transgénicas derivadas del genotipo Temporalero A95

El análisis de la actividad trealasa en líneas generadas de la variedad Temporalero A95 mostró porcentajes de disminución de actividad trealasa en todos los casos respecto a plantas no transformadas (Figura 24). En hoja, el porcentaje de disminución correspondió del 94 (líneas 220 y 144) al 39% (126); en tallo con valores similares del 80 al 97% de disminución de actividad trealasa respecto al control. En raíz la actividad trealasa para plantas silvestres alcanza niveles cercanos al 0.1 µgr de Glu mgr Prot⁻¹ hr⁻¹ que es el mayor valor registrado en este experimento, en la clona 220 fue efectivamente inhibida en un 100% en tanto que en las líneas 144 y 126 se inhibió en un rango del 42 al 9% respectivamente (Figura 24).

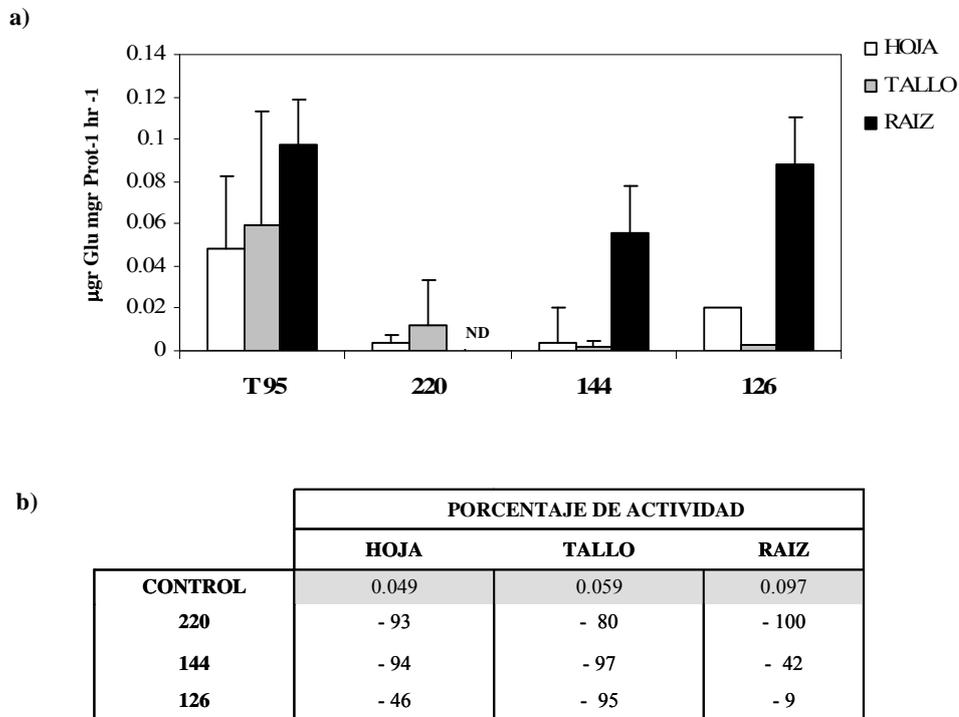


FIGURA 24. Actividad trealasa en plantas del genotipo Temporalero A95. a) Niveles de actividad trealasa en μgr de Glu mgr Prot⁻¹ hr⁻¹ en hoja, tallo y raíz de plantas control y transgénicas mantenidas bajo condiciones de cultivo *in vitro*; **b)** Cuadro comparativo de los porcentajes de actividad trealasa respecto al control. ND, No detectada.

7.6 Análisis del Contenido de Trealosa en Plantas con Inhibición de Trealasa

Con el fin de determinar si la disminución de actividad trealasa aumentó los niveles de trealosa en arroz, se determinó la concentración de trealosa presente en raíces de plantas transgénicas y plantas silvestre en condiciones de no estrés y estrés por sequía en invernadero. La determinación del contenido de trealosa y otros azúcares solubles presentes en raíz, se realizó mediante su análisis en cromatografía de gases. El perfil de azúcares obtenidos fue posteriormente analizado por espectrofotometría de masas para determinar la naturaleza de los compuestos presentes. Los azúcares presentes identificados en raíz fueron glucosa, sacarosa y en algunos casos trealosa (Figura 25).

Los datos obtenidos del perfil cromatográfico en plantas silvestres, muestran similar contenido de trealosa para ambos genotipos alrededor del 0.3 mgr gr^{-1} de peso seco y el tratamiento de sequía constituye un factor para la acumulación de trealosa por arriba del 50%. Entre las líneas transgénicas de ambos genotipos se encontraron casos de mayor acumulación de trealosa especialmente en condiciones de sequía.

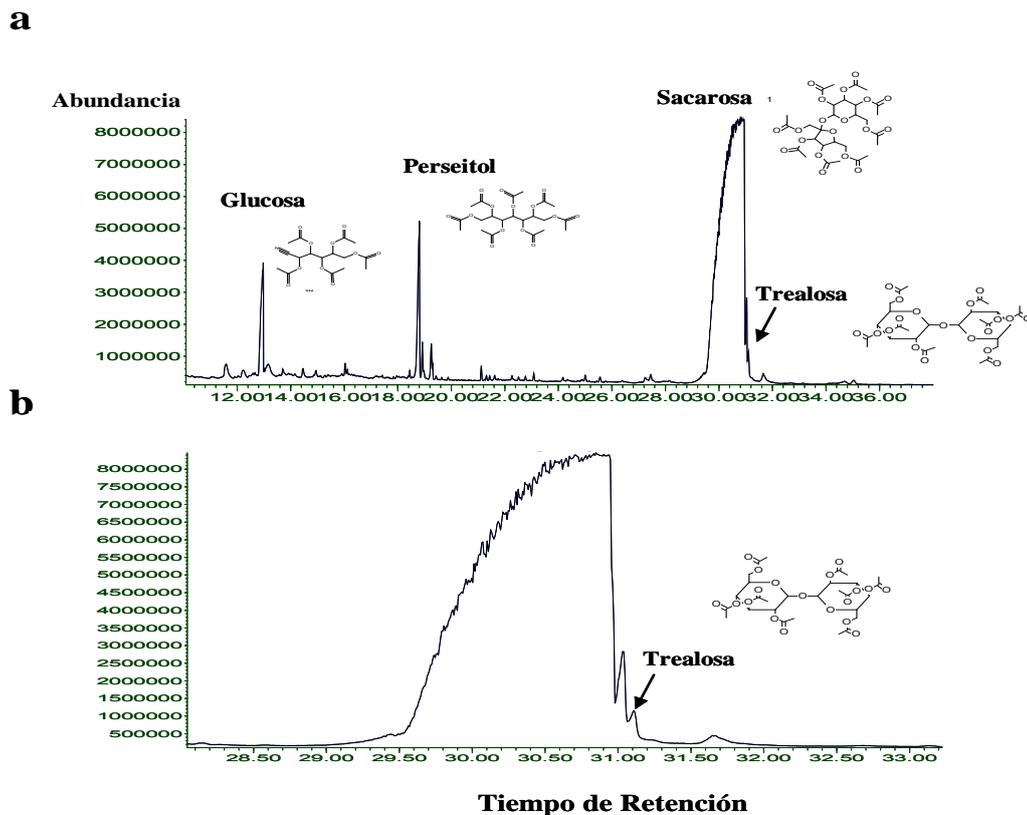


FIGURA 25. Cromatograma de azúcares presentes en raíz. a) Perfil completo de azúcares de raíz en planta productora de trealosa; **b)** Detalle de cromatograma donde se observa la detección de trealosa.

7.6.1. Contenido de trealosa en plantas transgénicas del genotipo Morelos A98

Los niveles de trealosa en plantas del genotipo Morelos A98 creciendo en condiciones de riego corresponden a los 0.32 mgr gr⁻¹ de peso seco y existe un incremento a 0.53 mgr gr⁻¹ de peso seco en condiciones de estrés por sequía. En líneas transgénicas bajo condiciones de riego el contenido de trealosa fluctuó entre los 0.12 a los 0.49 mgr gr⁻¹ de PS; las líneas 137 y 76 se encontraron por arriba respecto al control sin encontrarse diferencias significativas.

En condiciones de sequía las líneas 137, 76 y 226 alcanzaron concentraciones apenas superiores a los 0.3 mgr gr⁻¹ de peso seco; en tanto que las líneas 71 y 75 alcanzaron niveles de trealosa de 0.69-0.78 mgr gr⁻¹ de peso seco respectivamente lo que corresponde a un incremento del 30 al 50% en su concentración respecto a plantas silvestres. El contenido de trealosa en condiciones de sequía de las líneas 75 y 71 (0.69 y 0.72 mgr gr⁻¹ de peso seco) mostró diferencias significativas cuando se compararon a plantas silvestres. El incremento corresponde a un 300% y 100% respectivamente por arriba de plantas no transformadas.

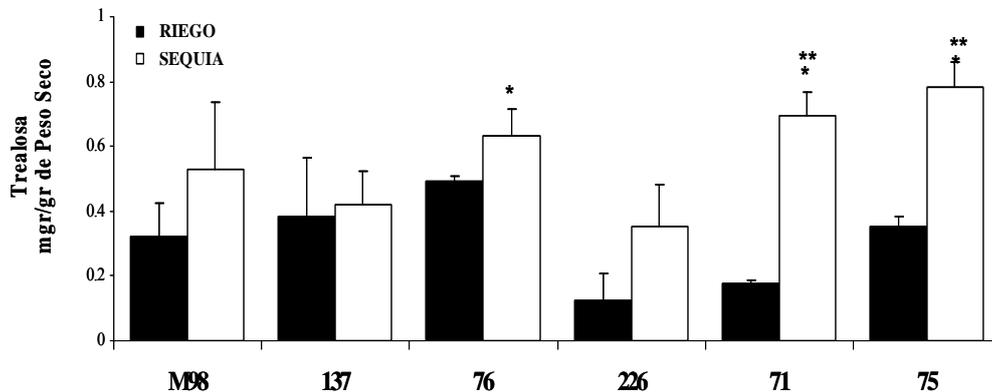


FIGURA 26. Nivel de trealosa en raíces de plantas transgénicas del genotipo Morelos A98. Contenido de trealosa en raíces provenientes de plantas sometidas a estrés por sequía en condiciones de invernadero. * Dif. Sig. respecto a planta Morelos A98 en las mismas condiciones; ** Dif. sig. respecto a las condiciones de riego.

7.6.1.1 Perfil de carbohidratos no estructurales

Glucosa. Los niveles de glucosa de líneas transgénicas fueron ligeramente menores a plantas silvestres (5.5 mgr gr^{-1} de peso seco). En condiciones de sequía decaen significativamente los niveles de glucosa en plantas no transformadas, a diferencia de las líneas transgénicas ya que sólo se observaron ligeras variaciones manteniendo los niveles relativamente uniformes tanto en condiciones de riego y sequía (Figura 27).

Sacarosa. En condiciones de riego se observaron altos contenido de sacarosa en todas la plantas ($100\text{-}150 \text{ mgr gr}^{-1}$ peso seco), destacándose la línea 76 con 175 mgr gr^{-1} de peso seco. Sin embargo las condiciones de sequía afectaron visiblemente los niveles de este azúcar en forma uniforme para todas las plantas analizadas con una reducción del 50% respecto a las condiciones de riego (Figura 27).

Almidón. En ambas condiciones los niveles de almidón más altos se registraron en la línea 75 (6.33 mgr gr^{-1} de peso seco) y el tratamiento de sequía no afecto significativamente el contenido de almidón en plantas silvestres y líneas transgénicas (Figura 27).

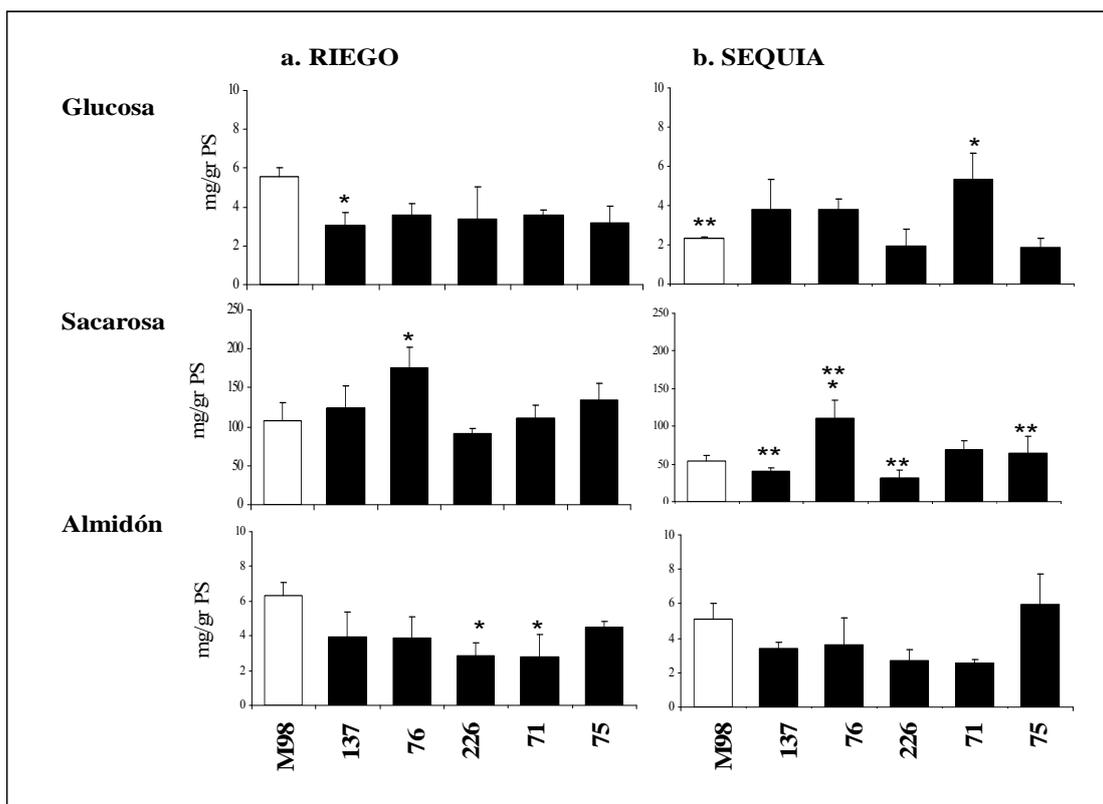


FIGURA 27. Perfil de Carbohidratos no estructurales en plantas transgénicas del genotipo Morelos A98. Azúcares analizados en plantas bajo a) condiciones de riego y b) condiciones de sequía. * Dif. sig. respecto a planta Morelos A98; ** Dif. sig. respecto a las condiciones de riego.

7.6.2 Contenido de trealosa en plantas transgénicas del genotipo Temporalero A95.

En condiciones de riego plantas del genotipo Temporalero A95 acumulan 0.35 mgr gr^{-1} de peso seco de trealosa y bajo un tratamiento de sequía incrementaron su concentración a 0.55 mgr de trealosa gr^{-1} de peso seco. En condiciones de riego, todas las líneas transgénicas generadas de este genotipo presentaron niveles similares de contenido de trealosa en raíz ($0.25 \text{ mgr mgr gr}^{-1}$ de peso seco), estos niveles de acumulación se ubicaron por debajo del obtenido en plantas silvestres (Figura 28).

El tratamiento de sequía indujo acumulación de trealosa en todas las líneas transgénicas; las líneas 220 y 144 con niveles de trealosa de 0.42 y 0.24 mgr gr^{-1} de peso seco no superaron la concentración de las plantas silvestre, al contrario de la línea 126 que acumuló 0.87 mgr trealosa gr^{-1} de peso seco. Estadísticamente no se encontraron diferencias significativas en los niveles de trealosa de las líneas transgénicas respecto a plantas silvestres en ambas condiciones. Sin embargo es importante mencionar que la línea 126 incrementó significativamente la acumulación de trealosa en condiciones de sequía respecto a las condiciones de riego (Figura 28).

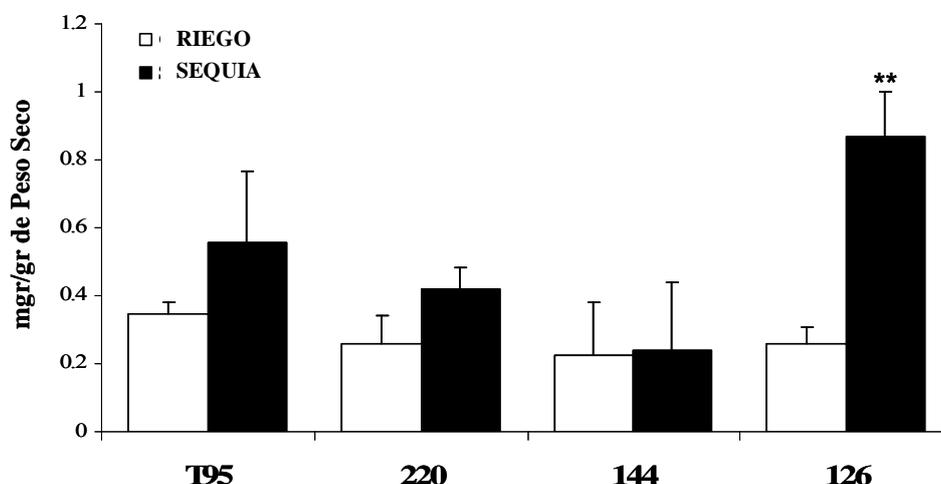


FIGURA 28. Nivel de trealosa en raíces de plantas transgénicas del genotipo Temporalero A95. Contenido de trealosa en raíces provenientes de plantas sometidas a estrés por sequía en condiciones de invernadero. ** Dif. sig. respecto a las condiciones de riego.

7.6.2.1 Perfil de carbohidratos no estructurales

Glucosa. En la planta silvestre el contenido de este azúcar se mantuvo sin variación respecto al tratamiento de sequía. La línea 220 se destacó por su alto contenido de glucosa (8.07 mgr gr^{-1} de peso seco) sin mostrar afectaciones significativas por las condiciones de estrés. Las líneas 144 y 126 con contenido de glucosa similar a la planta silvestre ($\sim 4 \text{ mgr gr}^{-1}$ de peso seco), mostraron un ligero incremento en condiciones de sequía (Figura 29).

Sacarosa. El alto contenido de sacarosa de las plantas tipo silvestres y la línea 220 en condiciones de riego ($\sim 250 \text{ mgr gr}^{-1}$ de peso seco) fue afectado por la sequía disminuyendo significativamente (100 y 50 mgr gr^{-1} de peso seco, respectivamente). En tanto que en las líneas 144 y 126 registraron menor concentración de sacarosa (100 - 150 mgr gr^{-1} de peso seco), pero éste no se vio afectado bajo condiciones de estrés (Figura 29).

Almidón. En condiciones de riego se registraron bajos niveles de almidón para la planta silvestres y líneas transgénicas en general ($\sim 4.0 \text{ mgr gr}^{-1}$ de peso seco); sin embargo, la línea 220 presentó significativamente menor contenido de almidón (2.1 mgr gr^{-1} de peso seco). La aplicación de sequía afectó negativamente en la acumulación de almidón en planta tipo silvestre; sin embargo en forma general el tratamiento de sequía no afectó la acumulación de almidón en líneas transgénicas e indujo fuertemente su acumulación en la línea 126 (7.7 mgr gr^{-1} de peso seco) (Figura 29).

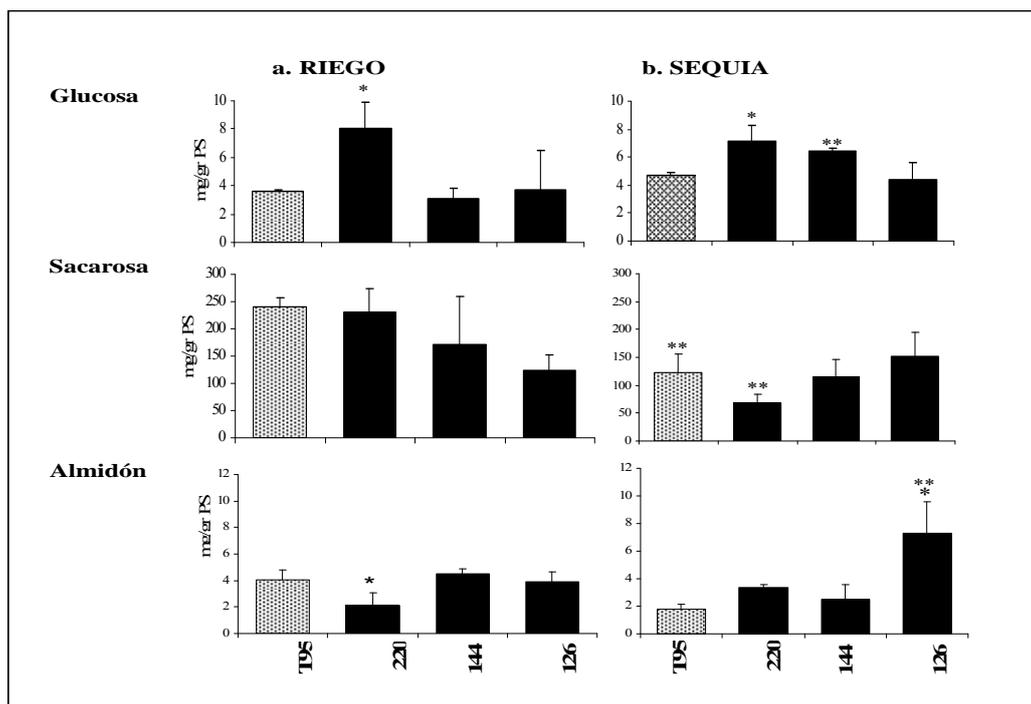


FIGURA 29. Perfil de carbohidratos no estructurales en plantas transgénicas del genotipo Temporalero A95. Azúcares analizados en plantas bajo a) condiciones de riego y b) condiciones de sequía. * Dif. sig. respecto a planta Temporalero A95; ** Dif. sig. respecto a las condiciones de riego.

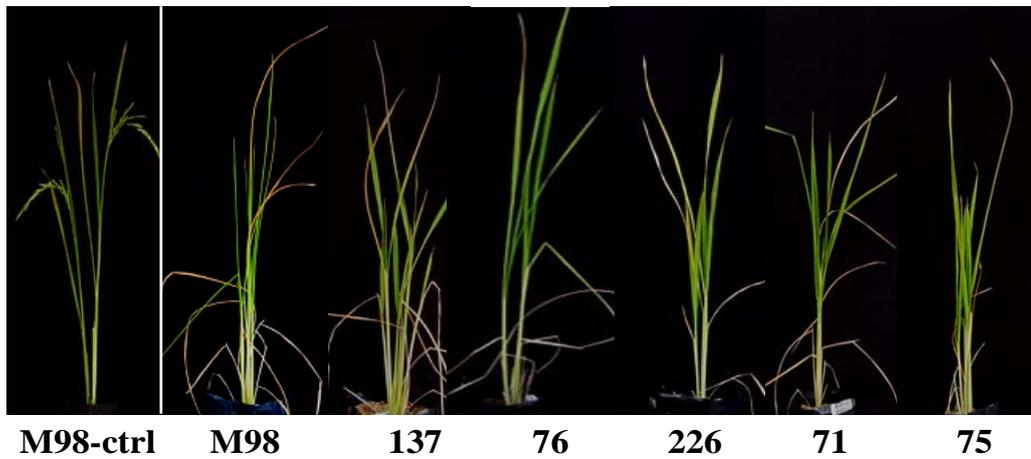
7.7 Morfología de plantas con inhibición de Actividad Trealasa

La inhibición de la actividad trealasa en plantas derivadas de los genotipos Morelos A98 y Temporalero A95 resultó en plantas con características fenotípicas similares a las plantas silvestres en condiciones de riego. El análisis detallado de las características fenológicas y hábitos de crecimiento en condiciones de riego y sequía, mostraron sutiles diferencias en cuanto a la altura de la planta, producción de materia seca de hoja y raíz, duración del estado vegetativo y comportamiento ante el estrés de sequía aplicado.

7.7.1 Plantas transgénicas derivadas del genotipo Morelos A98

De las líneas generadas, las líneas 76 y 226 mostraron un mejor desarrollo que plantas silvestres; puesto que mostraron mayor altura (Figura 30 b). En general, todas las líneas transgénicas produjeron ligeramente mayor materia seca en hoja en condiciones de riego (Fig. 30 b). La arquitectura de la raíz no se modificó mayormente dado que todas las plantas produjeron raíces de 36 a 43 cms de longitud en condiciones de riego (Figura 30 b) sin embargo se registró un incremento en el peso seco de raíz en las líneas 137 y 226 en aprox. 0.2 gr de peso seco por arriba del control (0.9 gr de peso seco) (Figura 30 a).

a



b

LINEAS	Altura de la Planta *		Long de la Raíz *		Etapa Fenológica		Nivel de Estrés
	Control	Sequía	Control	Sequía	Control	Sequía	Sequía
Morelos A98	86 ±4	89 ±7	43 ±3	46 ±6	Llenado de G.	Vegetativa	4
137	69 ±5	62 ±8	36 ±2	42 ±2	Paniculación	Vegetativa	2
76	95 ±10	89 ±8	30 ±4	40 ±4	Paniculación	Vegetativa	2
226	99 ±6	84 ±3	40 ±6	45 ±2	Paniculación	Vegetativa	2
71	80 ±2	83 ±10	43 ±2	46 ±3	Paniculación	Vegetativa	2
75	82 ±2	81 ±6	42 ±3	46 ±3	Paniculación	Vegetativa	2

FIGURA 30. Características morfológicas de plantas transgénicas del genotipo Morelos A98 sometidas a sequía. a) Aspecto general de plantas control Morelos A98 y líneas transgénicas sometidas a tratamiento de sequía. Morelos A98-w.t, planta control en condiciones de crecimiento normal; M98, planta control en estrés. **b)** Características morfológicas y etapa fenológica alcanzada de las plantas control Morelos A98 y líneas transgénicas observadas en condiciones control y de sequía. * cms. **Nivel de estrés:** (1) hojas expuestas, (2) hojas en ángulo respecto de la nervadura principal, (3) hojas plegadas a lo largo de nervadura principal, (4) enrollamiento total de hoja. Los datos corresponden a lecturas realizadas al término del tratamiento de sequía y representan el promedio de tres plantas colectadas en tiempos independientes (excepto en condiciones de riego) con similar porcentaje de CC.

Datos obtenidos del análisis de biomasa de hoja y raíz en condiciones de riego y sequía arrojó los siguientes datos. La aplicación del tratamiento de sequía provocó la disminución de producción de materia seca de hoja, a excepción de líneas 71 y 75 que produjeron similar cantidad de biomasa foliar que en condiciones de riego; las líneas 137 y 76 produjeron significativamente menos materia seca (52 y 74% respectivamente) respecto a la planta silvestre y el resto de las líneas transgénicas (Figura 31). Además se observó un incremento en la longitud de la raíz en general de 3-6 cms pero sin ganancia en biomasa, la línea 76 produjo significativamente menos materia seca que el control bajo estas condiciones (60% menos). El análisis de la producción de biomasa foliar y de raíz en condiciones de sequía en plantas silvestres y líneas transgénicas no reveló diferencias significativas respecto a las condiciones de riego. Sin embargo un aspecto importante es que todas las plantas sometidas a sequía se mantuvieron en etapa vegetativa retrasando el inicio de la etapa reproductiva (Figura 30).

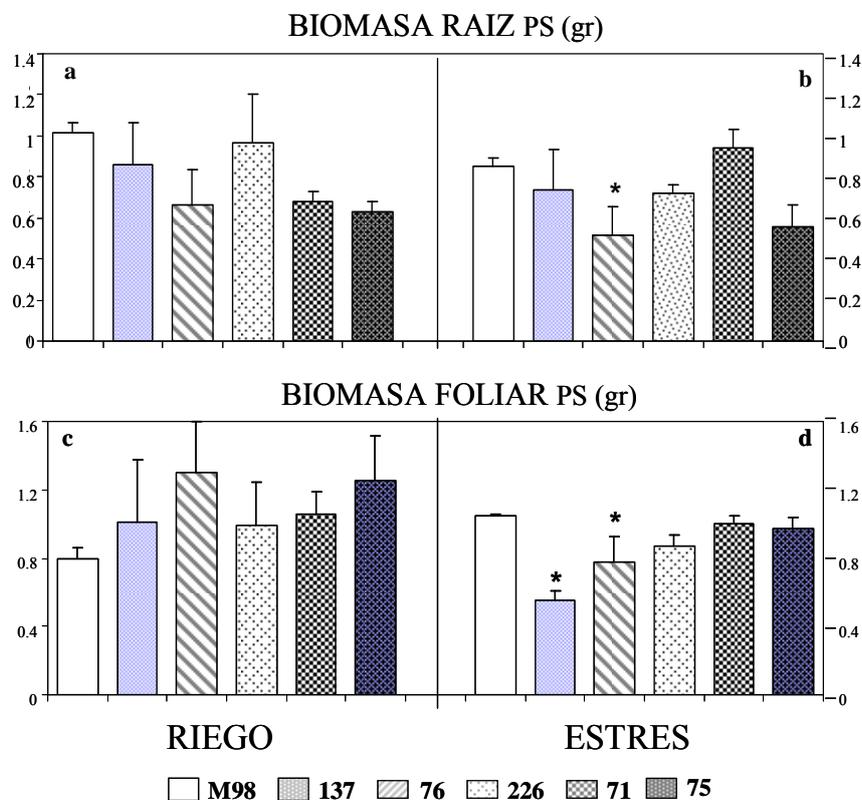


FIGURA 31. Producción de biomasa en líneas transgénicas del genotipo Morelos A98. Biomasa de raíz en plantas sometidas a a) condiciones de riego y b) condiciones de sequía. Biomasa de hoja en plantas sometidas a c) condiciones de riego y d) condiciones de sequía. * Dif. sig. respecto a planta silvestre en las mismas condiciones; ** Dif. sig. respecto a las condiciones de riego.

7.7.2 Plantas transgénicas derivadas del genotipo Temporalero A95

Las plantas de líneas transgénicas 144 y 126 fueron fenotípicamente similares a plantas silvestres con alturas promedio de 75 cms. La línea 220 mostró cambios fenotípicos interesantes dado que su altura no superó los 60 cms, así como una coloración verde intenso de sus hojas (Figura 32). El ciclo de desarrollo no fue afectado, las líneas transgénicas y plantas silvestres alcanzaron la etapa reproductiva en específico la etapa de llenado y producción de grano maduro; a excepción de la línea 220 la cual se vio ligeramente retrasado el inicio de la etapa reproductiva dado que al momento de la colecta se encontró en la etapa de paniculación.

Datos obtenidos del análisis de biomasa de hoja y raíz en condiciones de riego y sequía evidenció los siguientes comportamientos. La producción de biomasa de las líneas 220 y 126 fueron superiores a plantas silvestres. Es interesante mencionar que la línea 220 a pesar de su

baja altura produjo 40% más biomasa foliar que plantas silvestres (1.2 gr de peso seco); la línea 126 se destacó por una producción significativamente mayor de biomasa (1.4 gr de peso seco) lo que constituye un 65% más que las plantas silvestres (Figura 33). La línea 126 así mismo se destaca por la producción de biomasa de raíz (1.38 gr de peso seco), 56% superior a las plantas silvestres.

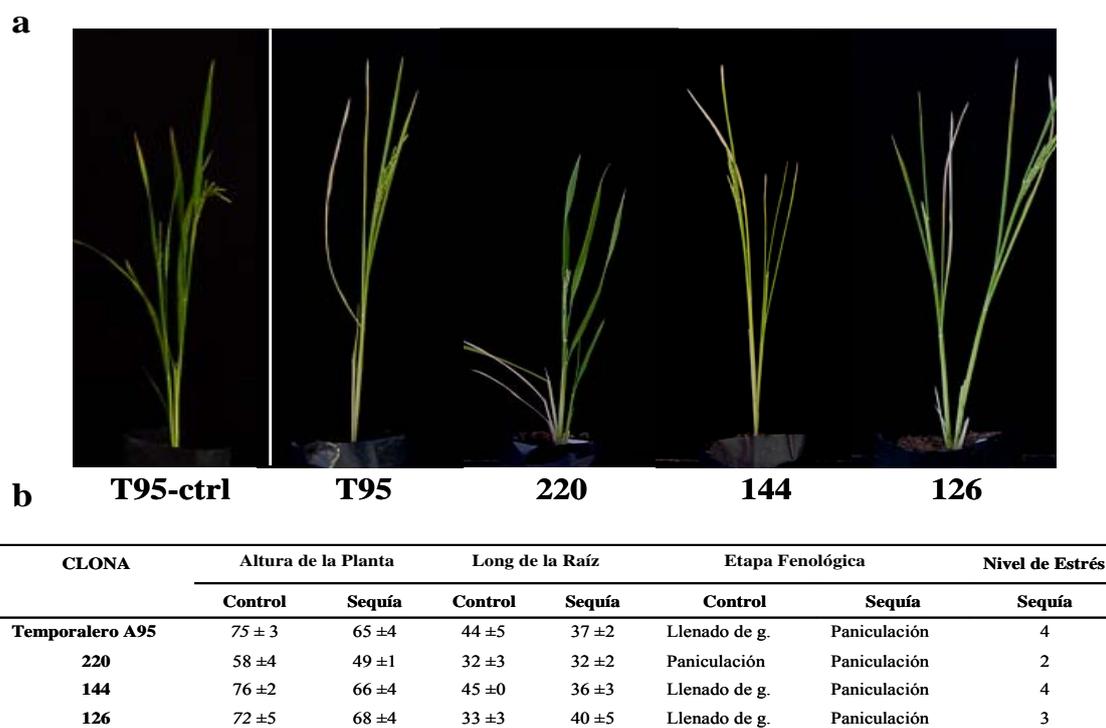


FIGURA 32. Características morfológicas de plantas transgénicas del genotipo Temporalero A95 sometidas a sequía. a) Aspecto general de plantas control Temporalero A95 y líneas transgénicas sometidas a tratamiento de sequía. Temporalero A95-w.t., planta control en condiciones de crecimiento normal; Temporalero A95, planta control en estrés. **b)** Características morfológicas y etapa fenológica alcanzada de las plantas control Temporalero A95 y líneas transgénicas observadas en condiciones de riego y sequía. * cms. **Nivel de estrés:** (1) hojas expuestas, (2) hojas en ángulo respecto de la nervadura principal, (3) hojas plegadas a lo largo de nervadura principal, (4) enrollamiento total de hoja. Los datos corresponden a lecturas realizadas al término del tratamiento de sequía y representan el promedio de tres plantas colectadas en tiempos independientes (excepto en condiciones control) con porcentajes similares de CC de suelo.

Bajo condiciones de sequía las plantas se vieron afectadas en el crecimiento dado que no alcanzaron la altura registrada en condiciones de riego, también disminuyó la producción de materia seca en diferentes magnitudes. El tratamiento de sequía afectó la biomasa de hoja y raíz generada por líneas 220 y 126 así como plantas silvestres; la línea 144 mantuvo su producción relativamente estable en ambas condiciones. En general la arquitectura de raíz no se vio afectada a excepción de la línea 126, en la cual se observó un moderado incremento en su longitud pero sin afectar la biomasa. La producción de materia seca de raíz se ve afectada significativamente en planta silvestre (55% menor) y la línea 126 (70% menor). Sin embargo es importante mencionar que la línea 126 mostró el mayor rendimiento bajo condiciones de

riego y sequía. Todas las líneas transgénicas y plantas silvestres retrasaron el inicio de la etapa reproductiva respecto a las condiciones de riego, el material colectado se encontró en la etapa de emergencia de panícula (Figura 33).

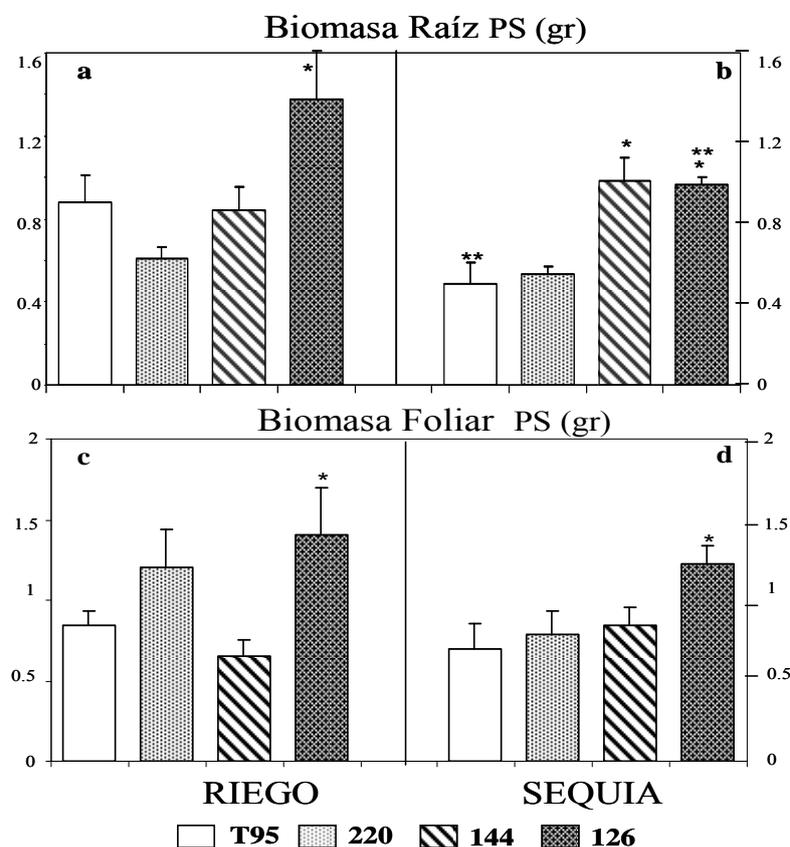


FIGURA 33. Producción de biomasa en líneas transgénicas del genotipo Temporalero A95. Biomasa de raíz en plantas sometidas a **a)** condiciones de riego y **b)** condiciones de sequía. Biomasa de hoja en plantas sometidas a **c)** condiciones de riego y **d)** condiciones de sequía. * Dif. sig. respecto a planta silvestre en las mismas condiciones; ** Dif. sig. respecto a las condiciones de riego.

7.8 Análisis de Tolerancia a Sequía

7.8.1 Tolerancia en líneas transgénicas del genotipo Morelos A98

El grado de tolerancia a sequía en las líneas transgénicas fue analizado según el nivel de enrollamiento de la hoja así como la capacidad de retención de agua evaluado por el CRA de hoja. La aplicación del tratamiento de sequía afectó negativamente a plantas silvestres, bajo estas condiciones se presentó un enrollamiento total de todas sus hojas (nivel 4 de estrés). Las líneas transgénicas presentaron un enrollamiento moderado, oscilando entre el nivel 2 y 3 de estrés y el análisis de CRA comprobó que las líneas transgénicas en condiciones de estrés retuvieron el agua en sus hojas en mayor porcentaje respecto a plantas control. En condiciones de estrés, plantas silvestres presentaron un 50% de CRA en hoja, en tanto que las líneas

transgénicas retuvieron el agua en sus hojas con mayor eficiencia, las líneas 76 y 75 mostraron significativamente mayor CRA (81 y 90% respectivamente). Las líneas 226 y 71 también se vieron afectadas en el contenido de CRA bajo condiciones de sequía, pero sin mostrar enrollamiento de hoja (Fig. 34 b).

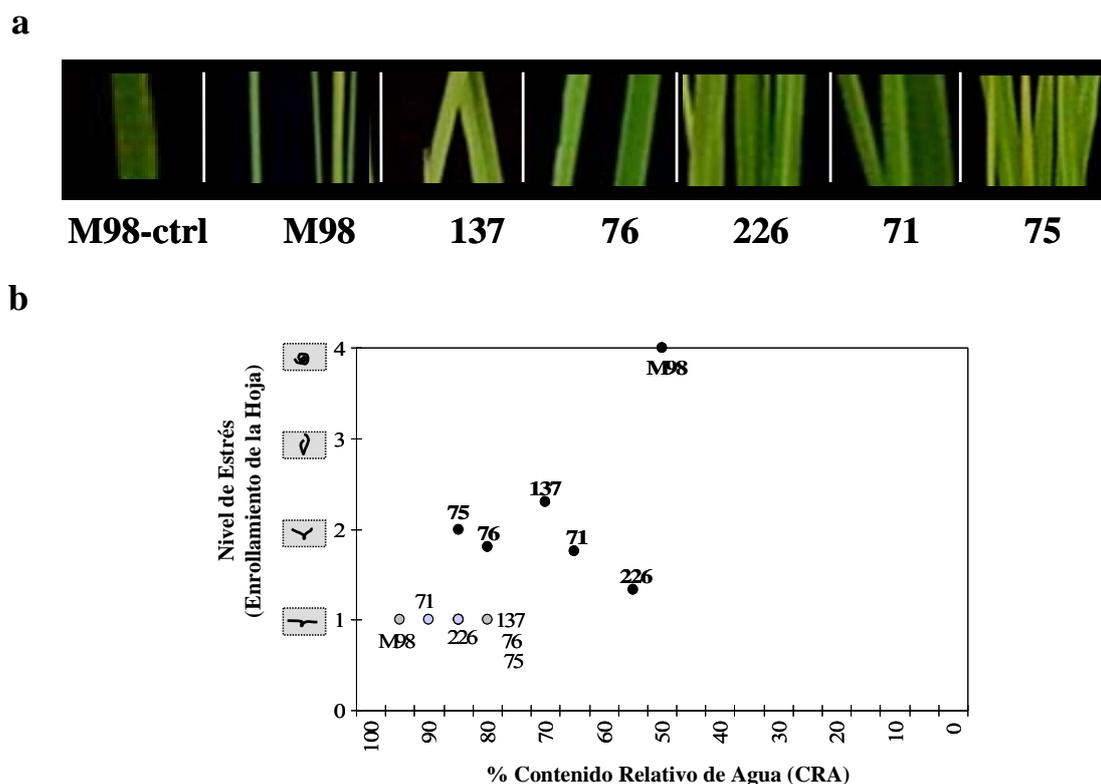
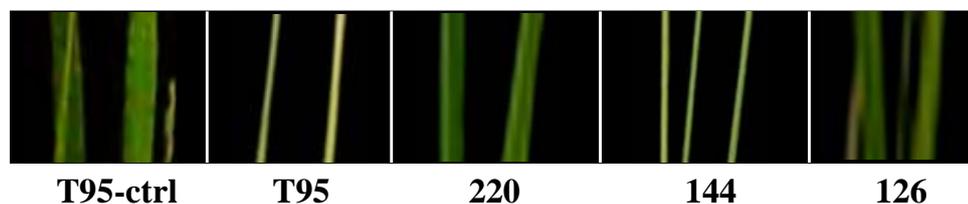


FIGURA 34. Análisis de tolerancia a sequía en líneas transgénicas derivadas del genotipo Morelos A98. a) Detalle del fenotipo (enrollamiento de hoja) en plantas sometidas a sequía. M98-w.t., planta silvestre en condiciones de riego; M98, planta silvestre en condiciones de sequía. **b)** Relación del porcentaje de CRA de hoja y el nivel de estrés desarrollado al final del tratamiento de sequía. ○ Riego, ● Sequía.

7.8.2 Tolerancia de líneas transgénicas del genotipo Temporalero A95

Aplicación del tratamiento de sequía en plantas del genotipo Temporalero A95 indujo el enrollamiento total de hoja pero con relativamente alto contenido de CRA en hoja (65%). En forma general las líneas transgénica no mejoraron sustancialmente su capacidad de retención de agua pero desarrollaron menor nivel de estrés en hoja cuando se compararon con plantas silvestres (Figura 35). Plantas de la línea 144 desarrollaron un alto grado de enrollamiento total de hojas (nivel 4) al igual que la planta silvestre con 60-70% de CRA en hoja. En condiciones de sequía la línea 126 perdió un 50% de CRA en hoja, sin embargo desarrolló una mayor tolerancia dado que no sobrepasó el nivel 3 de enrollamiento de hojas. La línea de mejor tolerancia a las condiciones de sequía fue la línea 220, mantuvo el CRA en hoja (75%) y con bajo nivel de estrés (nivel 2).



b

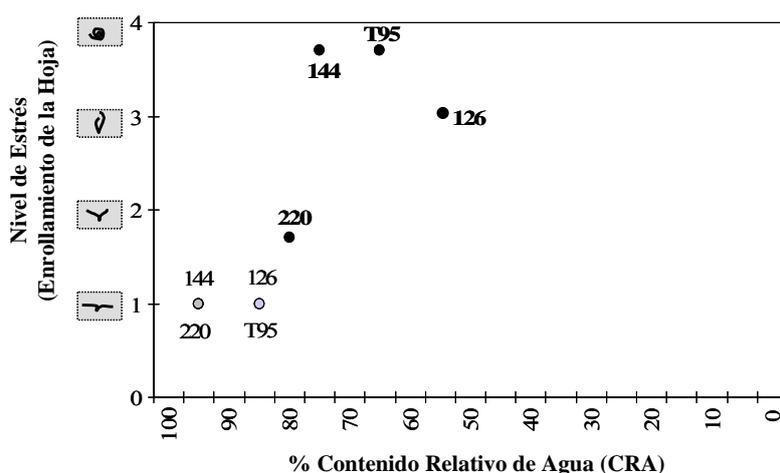


FIGURA 35. Análisis de tolerancia a sequía en líneas transgénicas del genotipo Temporalero A95. a) Detalle del fenotipo (enrollamiento de hoja) en plantas sometidas a sequía. T95-w.t., planta silvestre en condiciones de riego; T95, planta silvestre en condiciones de sequía. **b)** Relación del porcentaje de CRA de hoja y el nivel de estrés desarrollado al final del tratamiento de sequía. ○ Riego, ● Sequía.

7.9 Capacidad Fotosintética en Plantas Transgénicas

7.9.1 Parámetros fotosintéticos en plantas transgénicas derivadas del genotipo Morelos A98

La fotosíntesis neta de las líneas transgénicas fue medida al final del tratamiento de sequía. En condiciones de riego, las líneas transgénicas presentaron igual o en algunos casos superior actividad fotosintética que las plantas silvestres ($\sim 5 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$) (Figura 36). Las líneas 71 y 75 registraron una fotosíntesis neta superior en un rango de 35 y 64% respectivamente, cuando se compara con plantas silvestres. El tratamiento de sequía en plantas silvestre provocó una disminución del nivel fotosintético cayendo a $1.9 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$, en tanto que todas las líneas transgénicas mantuvieron su nivel fotosintético, todas con una alta diferencia significativa en condiciones de estrés. Las líneas 76 y 226 de manera interesante mostraron un incremento significativo de su actividad fotosintética en condiciones de sequía en un 200% respecto a las condiciones de riego, alcanzando valores de 12 y $10 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ respectivamente.

Los niveles de conductancia y resistencia estomática fueron evaluados simultáneamente que la fotosíntesis neta. En condiciones de riego, las plantas, control y líneas transgénicas, mostraron niveles de conductancia estomática fluctuando entre 0.2 y 0.4 $\mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$. Las condiciones de sequía afectaron significativamente la conductancia estomática en plantas silvestres y líneas 71 y 75 (disminución del 40 al 65%). En tratamiento de sequía, la línea 76 aumentó significativamente la conductancia estomática, y el resto de las líneas no mostraron variación. La resistencia estomática en condiciones de riego mostró niveles de entre 2 y 5 s cm^{-1} similar para todas las plantas, a excepción de la línea 137 con valor cercano a los 6 s cm^{-1} significativamente mayor a la planta control silvestre. Como se esperaba las condiciones de sequía provocaron un aumento en la resistencia estomática de la hoja en plantas silvestres respondiendo en forma similar para las líneas transgénicas; la línea 76 mostró menor resistencia estomática significativamente respecto a plantas silvestres. En línea 71 los valores fueron significativamente mayores a plantas silvestres y también con respecto a las condiciones de riego (Figura 37).

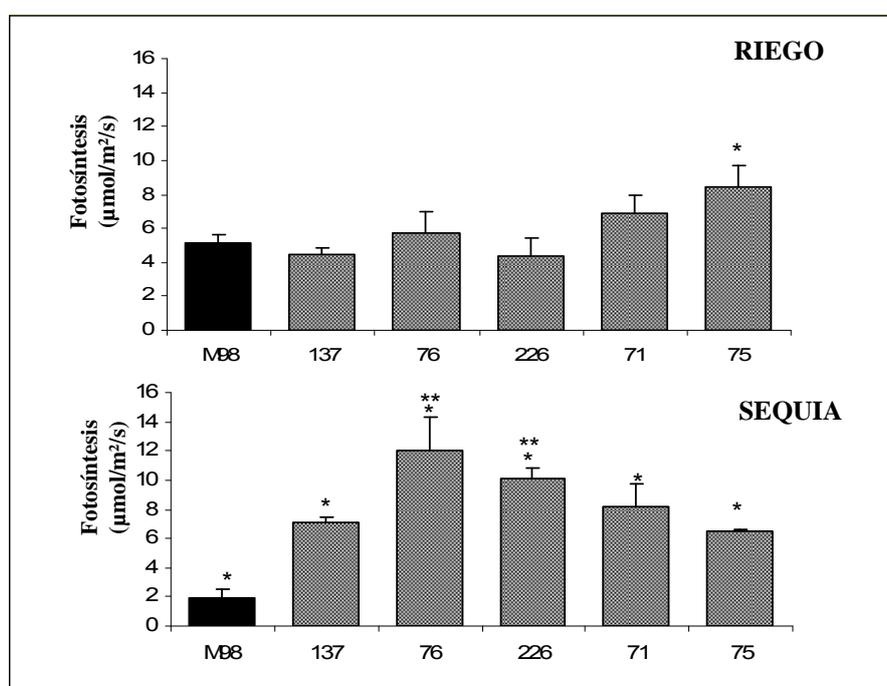


FIGURA 36. Fotosíntesis neta de líneas transgénicas del genotipo Morelos A98. * Dif. sig. respecto a planta silvestre; ** Dif. sig. respecto a las condiciones de riego.

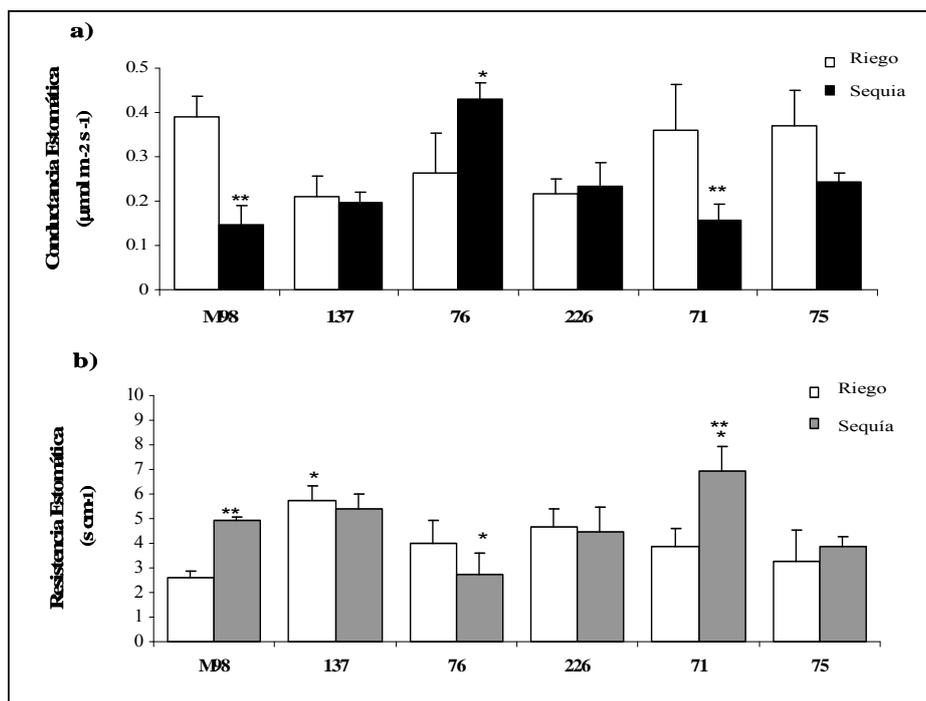


FIGURA 37. Conductancia y resistencia estomática del genotipo Morelos A98 y líneas transgénicas. Las plantas fueron evaluadas simultáneamente a la lectura de fotosíntesis en a) condiciones de riego y b) condiciones de sequía. * Dif. sig. Respecto a planta silvestre; ** Dif. sig respecto a las condiciones de riego.

7.9.2 Parámetros fotosintéticos en plantas transgénicas derivadas del genotipo Temporalero A95

En condiciones de riego la capacidad fotosintética de la línea transgénica 126 alcanzó un nivel de $10.3 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ lo que representa un incremento del 46% en la fotosíntesis neta respecto a plantas silvestres. Las líneas 220 y 144 registraron valores por debajo de la planta silvestre (4.7 y $5.2 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$ respectivamente). El tratamiento de sequía aplicado afectó negativamente la actividad fotosintética significativamente en plantas silvestres y línea 126. Sin embargo las líneas 220 y 144 mantuvieron la misma capacidad fotosintética respecto a las condiciones de riego y superior a plantas silvestres. Es importante mencionar que todas las líneas transgénicas registraron mayor actividad fotosintética en condiciones de sequía que plantas de tipo silvestre (Figura 38).

La conductancia estomática en condiciones de riego para plantas silvestres y líneas transgénicas se mantuvo a niveles similares tanto en condiciones de riego como de sequía (alrededor de $0.25 \mu\text{mol s}^{-1} \text{m}^{-2}$), sin presentar cambios significativos respecto plantas silvestres, con la excepción de la línea 126. Para esta línea, en condiciones de riego se observó un incremento significativo, así mismo la sequía indujo una disminución significativa de la conductancia estomática. De la misma manera la resistencia estomática, no mostró cambios significativos con respecto al tratamiento a sequía, a excepción de la línea 126, que conforme a lo anteriormente observado muestra una resistencia menor que el control en condiciones de

riego y aumenta significativamente en condiciones de sequía pero dentro de los niveles registrados por el resto de las plantas (Figura 39).

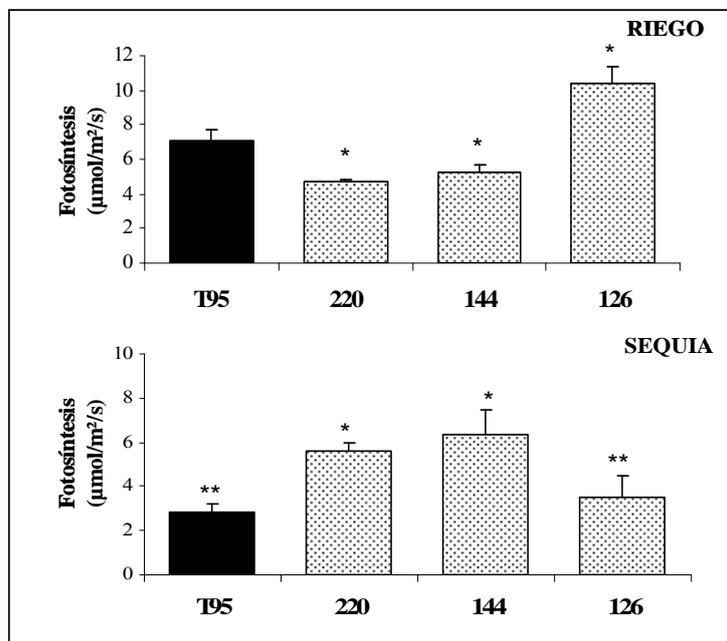


FIGURA 38. Fotosíntesis neta de líneas transgénicas derivadas del genotipo Temporalero A98. * Dif. sig. respecto a planta silvestre; ** Dif. sig. respecto a las condiciones de riego.

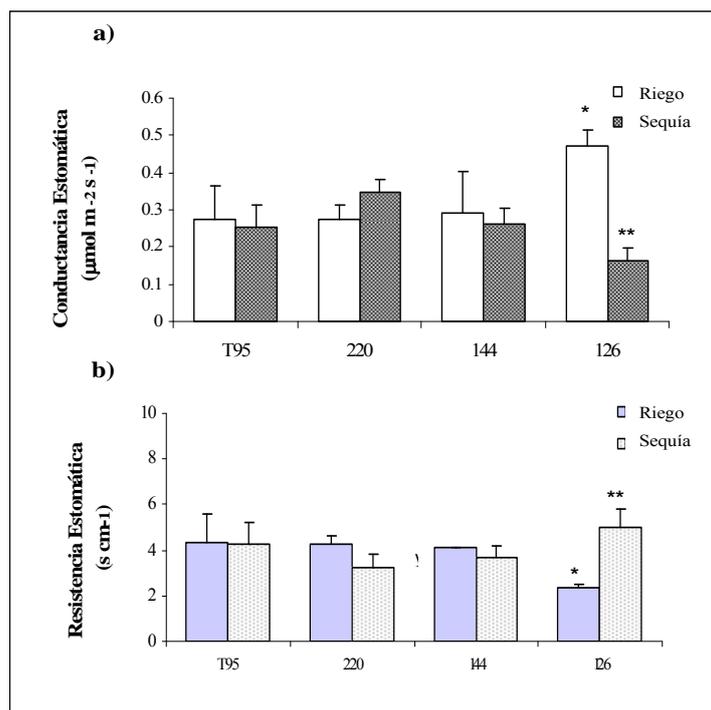


FIGURA 39. Conductancia y resistencia estomática de líneas transgénicas del genotipo Temporalero A95 Las plantas fueron evaluadas simultáneamente a la lectura de fotosíntesis en **a)** condiciones de riego y **b)** condiciones de sequía.* Dif. sig. respecto a planta silvestre; ** Dif. sig. respecto a las condiciones de riego.

DISCUSION

La acumulación de trealosa en la naturaleza, ha establecido el papel de esta como agente protector (Elbein et al. 1974; Müller et al. 1999) así como el papel de su metabolismo en procesos de regulación importantes como el crecimiento y desarrollo de la planta (Eastmond et al. 2002, van Dijken et al. 2004), utilización de carbohidratos (Schluepmann et al. 2004), además de adquisición de tolerancia a estrés hídrico, salino y térmico (Garg et al. 2002, Holmström et al. 1996, Pilon-Smits et al. 1998, Yeo et al. 2000). Por lo anterior, se ha analizado la capacidad de producción de trealosa distintas especies de plantas y su efecto en el crecimiento y desarrollo en condiciones de estrés abiótico. En el caso del arroz, que constituye un cultivo de altos requerimientos de agua y gran importancia económica, se ha buscado incrementar la capacidad de desarrollarse en ambientes de baja disponibilidad de agua mediante la acumulación de trealosa. En este trabajo se desarrollaron líneas transgénicas de arroz acumuladoras de trealosa y se analizó el efecto de la modificación del metabolismo de la trealosa (acumulación mediante inhibición de hidrólisis por la enzima trealasa) en la respuesta del arroz en condiciones de baja disponibilidad de agua.

Resistencia de plántulas de tabaco a la germinación en medios osmóticos. Gamez (2004) observó que plantas de tabaco con inhibición de trealasa eran capaces de crecer en ausencia de una fuente de carbono en condiciones *in vitro*, proponiendo a una mejor capacidad fotosintética la responsable de tal comportamiento. En este trabajo los análisis de germinación y crecimiento de plántulas de tabaco *in vitro* en condiciones de alta osmolaridad evidenciaron dos aspectos importantes. Por una parte, que la inhibición de trealasa permitió una mejor utilización de fuentes de carbono y menor sensibilidad en la etapa de germinación a altas concentraciones de azúcares, como se observó en el medio suplementado con 12% de sacarosa (Figura 11). Leyman et al. (2006) reportaron el uso del metabolismo de trealosa como herramienta para la selección de plantas transformadas en un medio de alta glucosa. Lo anterior basado en que la sobre-expresión del gen *AtTPS1* reduce fuertemente la sensibilidad a la glucosa en la etapa de germinación de *Arabidopsis* o regeneración de explantes en tabaco. En este estudio encontramos fenotipos más contrastantes respecto a los encontrados por Leyman et al. Se observó una completa inhibición del proceso germinativo y un vigoroso crecimiento de las líneas transgénicas en medios osmóticos. La principal diferencia se encuentra en la utilización de sacarosa como agente osmótico, ya que la glucosa utilizada por Leyman et al. es una fuente de energía disponible para el tejido no transformado que pudiera contribuir al crecimiento en tejido no transformado. Se ha observado que alta disponibilidad de azúcares induce la expresión de TPS y acumulación de T6P, y la acumulación de este sustrato sin una fuente metabolizable de carbón inhibe el crecimiento de la plántula (Schluepmann et al. 2004) La constante disponibilidad de sacarosa conduce a una progresiva

acumulación de T6P en plántulas, como se ha comprobado alta concentración de T6P bloquea la entrada de carbón a glucólisis (Schluepmann et al. 2003) y la trealosa presente puede contrarrestar tal efecto. La adición de trealosa, conduce a un pico incremento inmediato de T6P pero disminuye en un periodo de 24 hrs. (Schluepmann et al. 2004). Más importante la trealosa también induce la expresión del gen *TPPB*; este gen es una T6P-fosfatasa funcional; este dato implica un mecanismo de regulación de los niveles de T6P (Vogel et al. 1998). De esta manera la trealosa que probablemente esta presente en las semillas transformadas, tendrían la capacidad de regular los niveles de T6P inducidos por alta concentración de sacarosa, mecanismos que podría cooperar con la modulación de la resistencia a alto potencial osmótico observado por la capacidad de germinación en PEG.

La germinación y crecimiento en medio suplementado con PEG 3% permitió corroborar la adquisición de tolerancia al estrés osmótico, proporcionando ventajas en el crecimiento, obteniendo plantas más vigorosas, especialmente cuando se utilizó el promotor inducible por estrés rd29: TREas (Figura 13). Se ha observado que alta disponibilidad de azúcares específicamente sacarosa induce la expresión de genes TPS y conduce a una acumulación de T6P en *Arabidopsis* (Schluepmann et al. 2004). Acumulación de T6P sin una fuente de carbono metabolizable inhibe el crecimiento de la planta esto es consistente con rol de regulador del flujo metabólico. La ventaja que representa la manipulación del metabolismo de la trealosa como agente selectivo es que no se presentan efectos negativos y las plantas generadas son fácilmente evaluadas. Además de su uso como marcador de selección en protocolos de transformación vegetal, los fenotipos observados en la etapa de germinación de estas plántulas, permiten comprobar la resistencia a sequía de plántulas con inhibición de la trealasa por lo que representaría una doble ventaja en su utilización.

Cultivo de tejidos de arroz. Es ampliamente aceptado que el potencial de inducción de callo embriogénico y regeneración en cultivo de tejidos de arroz depende de numerosos factores, como el genotipo de la planta donadora, el nivel fisiológico del explante, composición y concentración de medio basal y los componentes orgánicos así como los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo (Jain 1997, Kyazuka et al. 1998). Entre todos estos factores, las diferencias genotípicas son las más importantes por lo que es considerable la variación en las respuestas obtenidas en el cultivo de tejidos de arces de la subespecie *Indica*. En general los arces de la subespecie *Indica* presentan una baja respuesta a la inducción y proliferación de callo embriogénico junto con el difícil mantenimiento del potencial embriogénico y la capacidad de regeneración de plántulas verdes. La obtención de callo embriogénico de arroz a partir de embriones maduros fue un protocolo altamente eficiente puesto que se obtuvo un cultivo de embriones con alta capacidad de división, compuesto de embriones en etapa globular principalmente de aspecto friable, estas características corresponden a un callo embriogénico y lo hacen un tejido apropiado para la transformación. En el proceso de regeneración en callo no transformado la cinetina (KIN) fue de respuesta más lenta que el BAP que indujo regeneración de plántulas sin raíz de forma más rápida y con buen vigor (Figura 18). Sin embargo la regeneración de plántulas en callo de líneas transgénicas se obtuvo en medio suplementado con cinetina (KIN) vía germinación de embriones, lo que se supone se debió al estado fisiológico de callo sometido al proceso de selección.

Transformación genética de arroz por biobalística. La eficiencia de transformación fue similar a la reportada para este protocolo (Valdez et al. 1998) por lo que indica el correcto establecimiento de esta técnica. La actividad de β -glucoronidasa presente en tejido 3 días post-bombardeo indica la eficiencia de transformación obtenida; en tanto que el análisis de expresión estable indicaría la naturaleza transgénica del tejido. Sin embargo en la literatura se ha reportado la pérdida de actividad por efecto del silenciamiento del gen β -glucoronidasa (Kohli et al. 1996), en este trabajo se observó que la actividad puede desaparecer a partir de 30 días post bombardeo por lo que la diferencia obtenida en la expresión de β -glucoronidasa entre la variedad Morelos A98 y Temporalero A95 puede deberse a distinta capacidad de expresar genes foráneos y el grado de silenciamiento genético a que esta sujeto cada genotipo. Las diferencias obtenidas en la generación de clonas a partir del bombardeo con micropartículas de oro y tungsteno se explica por la mayor densidad del oro capaz de penetrar a capas celulares mas profundas (Morrish et al. 1993). En tanto que las diferencias encontradas entre las variedades Morelos A98 y Temporalero A95 en el proceso de transformación en específico la selección y aparición de clonas probablemente sea debido una tasa de división celular distinta acentuado por una distinta tolerancia a la presencia del antibiótico higromicina en el medio de cultivo.

Inhibición de actividad trealasa. La actividad trealasa mantiene normales los niveles de trealosa posiblemente con el fin de prevenir los efectos detrimentales observados por su acumulación al afectar el metabolismo de carbón (Eastmond et al. 2002, Kolbe et al. 2005, van Dijken et al. 2004). En trigo se ha reportado que la actividad trealasa en raíz es ligeramente mayor en plantas tolerantes a salinidad y sequía, y que ésta disminuye bajo un tratamiento de sequía solamente en las plantas tolerantes y no así en plantas sensibles (El-Bashinti et al. 2005). En arroz, la actividad trealasa del genotipo tolerante (Temporalero A95) presenta significativamente mayor actividad que el genotipo sensible (Morelos A98) en todos los órganos analizados (Figura 23). La actividad trealasa en plantas transgénicas de ambas variedades mostraron distintos niveles de actividad en los distintos órganos. Se ha descrito anteriormente las diferencias existentes en la expresión de la trealasa en *Arabidopsis*, la expresión más alta se ha encontrado en órganos reproductores en relación a tejidos vegetativos; y en raíz, la actividad trealasa es mayor que en hoja y tallo (Müller et al. 2001). En líneas transgénicas derivadas de la variedad Morelos A98 el porcentaje de inhibición obtenido en hoja y tallo fue discreto; sin embargo de manera interesante en las líneas 75 y 76 fue posible detectar actividad trealasa dado que en plantas control no fue posible detectarlas. En las líneas 75 y 76 la actividad trealasa se relaciona directamente con el contenido de trealosa en raíz (discutido más adelante). En líneas transgénicas derivadas de la variedad Temporalero A95 se obtuvieron altos porcentajes de inhibición de actividad trealasa en hoja y tallo (50-95%) pero ligero efecto en raíz.

Anteriormente se ha reportado que existe una alta actividad trealasa en condiciones de alta disponibilidad de trealosa (exógena), probablemente como un mecanismo de regulación (Brodmann et al. 2002). Sin embargo el gen de trealasa no se induce por la trealosa dado que se observó un incremento de actividad antes de que se llevara a cabo la acumulación del azúcar. Es más probable que la actividad enzimática sea regulada por auxinas dado que se ha inducido actividad trealasa en raíces tratadas con auxinas, en tanto que la presencia de trealosa no afecta su actividad (Müller et al. 1995). El patrón de actividad trealasa resultante en líneas

transgénicas conserva significativa actividad en raíz que se relacionan positivamente con el contenido de trealosa y tolerancia a estrés (discutido más adelante). Es posible que este patrón de actividad trealasa sea positivo en la adquisición de tolerancia a estrés como sucede en trigo (El-Bashinti et al. 2005), y que exista un mecanismo de regulación específico responsable de este comportamiento.

Acumulación de trealosa en raíz. Las líneas transgénicas derivadas de la variedad Morelos A98 no mostraron una acumulación importante de trealosa en raíz en condiciones control puesto que no se observaron diferencias significativas entre ellas. La aplicación del estrés hídrico afectó positivamente en el mantenimiento de concentración o indujo en algunos casos mayor acumulación de trealosa en raíz de las plantas bajo estrés, encontrándose diferencia significativa para este efecto en las líneas 71 y 75 (Figura 27). La actividad trealasa en condiciones de no estrés en estas líneas presenta en común actividad trealasa en raíz. Las líneas restantes no mostraron variación significativa en la acumulación de trealosa con relación al efecto del estrés hídrico a pesar de existir una disminución de actividad trealasa en hoja y tallo. Anteriormente se ha observado que en plantas con modificaciones en el biosíntesis de trealosa, los niveles de trealosa no se incrementan de manera significativa a pesar de el efectivo incremento en la actividad de genes biosintéticos y a su vez no se ha detectado algún efecto localizado (Garg et al. 2002, Karim et al. 2007). En plantas silvestres de la variedad Temporalero A95 se observó una mayor capacidad de producción de trealosa, por lo que era probable obtener una mayor acumulación del azúcar en líneas transgénicas obtenidas de esta variedad; sin embargo no se encontraron diferencias significativas en las líneas transgénicas con respecto al control ya sea en condiciones de riego o bajo sequía (excepto línea 126) (Figura 28). De las líneas transgénicas generadas, la línea 126 se destaca debido a una acumulación significativa (200% mayor a silvestre) ocasionada por el efecto de la sequía respecto a las condiciones de riego; esta línea presentó actividad trealasa en raíz similar al control en raíz, pero significativamente menor en hoja y tallo.

En este punto, la raíz aparece como un órgano importante en la tolerancia a estrés mediada por el metabolismo de trealosa. En trigo se observó que cuando existe un estrés hídrico se induce la producción de trealosa en raíz indicada por la actividad de la enzima TPS, y a su vez ocurre una represión de la actividad trealasa en raíz en variedades tolerantes a estrés abiótico (El-Bashinti et al. 2005), lo que puede constituir un mecanismo de adaptación. Anteriormente se ha mencionado que la capacidad de sintetizar trealosa esta presente en todas las plantas y su producción es disparada específicamente por señales de estrés mediante la inducción de las enzimas TPS y TPP con efectos conocidos en la regulación del metabolismo y tolerancia a estrés abiótico; pero en la capacidad de regular el metabolismo de la trealosa para llevar a cabo su acumulación es probable que la actividad trealasa juegue un papel fundamental. En este trabajo se observó que existe la tendencia de acumulación de trealosa en raíz de la variedad con mayor grado de adaptación al estrés por sequía (evidenciado por el potencial de rendimiento en condiciones de secano), por lo que es posible que exista una estrecha relación entre la capacidad de regular el metabolismo de trealosa y la característica de resistencia a sequía en la generación de cultivos resistentes.

Niveles de carbohidratos no estructurales en plantas acumuladoras de trealosa. En plantas con modificaciones en el metabolismo de trealosa, se observó incremento en el contenido de azúcares no estructurales en hoja (Pilon-Smits et al. 1997), que concordaron con

elevada capacidad fotosintética y que sumada a la presencia de trealosa pudiesen ser en parte responsables del ajuste osmótico en contraparte con la planta silvestre. En *Arabidopsis* la inhibición química de la trealasa con Val A, conduce a fuertes alteraciones en el contenido de carbohidratos no estructurales (Müller et al. 2001). En estas plantas se encontró una reducción significativa en el contenido de almidón y sacarosa en flor, hoja y tallo. Además, el almidón se encontró significativamente reducido en raíces tratadas con Val A; no encontrándose cambios importantes en el contenido de glucosa, fructosa y azúcares tipo rafinosa (Müller et al. 2001). A pesar de lo anterior, se ha observado que la trealosa induce la acumulación masiva de almidón en hojas de *Arabidopsis* (inversión de la localización de carbono) (Wingler et al. 2000). En *Arabidopsis*, la trealosa induce enzimas biosintéticas de almidón pero la Val A por sí sola no (Wingler et al. 2000) lo que explicaría la contradicciones en el estudio realizado por Müller et al (2001). En este estudio, el contenido de carbohidratos no estructurales de arroz con inhibición post-transcripcional de la trealasa mostró similar perfil que *Arabidopsis* creciendo en 25mM de trealosa y en algunos casos las condiciones de sequía afectaron el contenido de estos azúcares. Cambios significativos fueron observados en el contenido de sacarosa, donde líneas transgénicas derivadas del genotipo Temporalero A95 además de mostrar mayor contenido de este azúcar que el genotipo Morelos A98, disminuyeron su contenido en manera inversamente proporcional al contenido de trealosa y en general la sequía afectó negativamente en la acumulación de este azúcar. Sin embargo las diferencias mas significativas fueron encontradas en el contenido de almidón; en que las líneas derivadas de Morelos A98 efectivamente disminuyeron el nivel de almidón como se reportó en *Arabidopsis* (Müller et al. 2001). Líneas transgénicas derivadas del genotipo Temporalero A95 no mostraron variaciones significativas en el contenido de almidón respecto a plantas control. De manera interesante la exposición a condiciones de sequía (y la acumulación de trealosa) incrementó el contenido de almidón en plantas transgénicas siendo éste significativo en la línea 126, lo que concuerda con lo observado en plantas de *Arabidopsis* expuestas a trealosa (Wingler et al. 2000) y la significativa acumulación de trealosa en líneas transgénicas derivadas del genotipo Temporalero A95.

Las variaciones significativas en el contenido de carbohidratos no estructurales observadas entre los distintos genotipos pudieran deberse al distinto grado de tolerancia a sequía de cada variedad y el distinto nivel de acumulación de trealosa. La acumulación de sustancias como el almidón puede cooperar a disminuir el daño ocasionado por la desecación ocurrida bajo el estrés hídrico. En granos de cebada y trigo obtenidos bajo condiciones de estrés hídrico, la proporción de almidón total mostró una tendencia a incrementar bajo estas condiciones (Pessarakli et al. 2005). Esta modificación del contenido de azúcares posiblemente indica la plasticidad de estos genotipos para contrarrestar la desecación del protoplasma; en arroz a nivel de raíz puede presentarse de la misma forma, como se observa en las líneas transgénicas derivadas de Temporalero A95. Los efectos del estrés abiótico al igual que los mecanismos de tolerancia al estrés abiótico son similares en órganos fuente y vertedero. Aunque el estrés actúa simultáneamente limitando tanto la fotosíntesis como la absorción de nutrientes, el principal problema para el rendimiento de los cultivos es la removilización y deterioro en la calidad de las reservas durante este periodo y durante la restauración de la normalidad metabólica, por lo que la mayor acumulación de carbohidratos en forma de almidón contribuiría a la tolerancia a las condiciones de estrés abiótico. Adicionalmente la T6P ha sido implicada recientemente en la regulación de la síntesis de almidón vía activación redox de la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGPasa), con implicación

directa en la utilización de azúcares a través de la síntesis de almidón en cloroplasto (Kolbe et al. 2005, Lunn et al. 2006), lo que explicaría el mayor contenido de almidón en plantas acumuladoras de trealosa. Cambios inducidos en los niveles de T6P por el contenido de azúcares pueden desempeñar un papel de suma importancia en coordinar la utilización de carbohidratos y producción de sustancias de reserva (Lunn et al. 2006); por lo que el estudio del metabolismo de trealosa tiene efecto directo sobre el rendimiento de los cultivos.

Efecto de la acumulación de trealosa sobre el crecimiento y fenotipo de arroz. Se ha reportado que la inhibición química de la trealasa por valA no afecta a nivel morfológico o en el desarrollo (Müller et al. 1995, 2001, Wingler 2000) y la sobre-expresión del gen de trealasa en *Arabidopsis* no tiene un fenotipo distinguible de plantas silvestres (Schluepmann et al. 2003) debido a que la expresión de trealasa y su inhibición no afecta el contenido de T6P. La producción de trealosa en plantas transgénicas presentan en algunos casos diferentes irregularidades de desarrollo, tales como retraso del crecimiento y una alteración en el fenotipo de la hoja (Goddijn et al. 1997, Pilon-Smiths et al. 1998). La razón para las desviaciones observadas en el patrón de crecimiento, aún no se ha comprendido completamente, pero posteriormente se comprobó que tales desviaciones son causado por una sobreproducción de T6P (Schluepmann et al. 2004, Karim et al. 2007). La estrategia propuesta en este trabajo consiste de la acumulación de trealosa sin la afectación de los niveles de T6P, por lo que se esperaba plantas sin efectos negativos sobre su crecimiento y desarrollo. La inhibición de trealasa resultó en líneas transgénicas de arroz con características morfológicas similares a las plantas control sin encontrarse afectaciones en la producción de biomasa foliar en condiciones de crecimiento normal en la variedad Morelos A98. El efecto general de estrés hídrico en las líneas transgénicas y control fue la disminución de biomasa foliar y de raíz excepción de las líneas 71 y 75, que presentaron los niveles más altos de acumulación de trealosa para esta variedad; sin embargo no se encontraron diferencias significativas entre líneas y plantas control para la producción de biomasa. En la variedad Temporalero A95 la producción de biomasa foliar en condiciones de estrés es mantenida a niveles similares a las condiciones control; la línea 126 se destacó con mayor producción de biomasa foliar y de raíz en condiciones control y de sequía; aspecto que concuerda al mayor nivel de trealosa en raíz. En la línea 220 se observó un fenotipo característico para plantas acumuladoras de trealosa, plantas con crecimiento limitado y coloración de hojas verde intensa (Cortina et al. 2005, Romero et al. 1997). Estos efectos pleiotrópicos asociados a la acumulación de trealosa son similares los reportados en tomate y tabaco (Cortina et al. 2005, Goddijn et al. 1997, Pilon-Smiths et al. 1998, Romero et al. 1997) donde se obtuvieron plantas con mayor producción de biomasa total en condiciones de estrés hídrico. Schluepmann et al. (2003) comprobó que pequeños cambios en el contenido de T6P es la responsable de tales fenotipos, altas concentraciones de T6P desarrolla plántulas con cotiledones verde intenso y de tamaño reducido; por lo que sería importante conocer si el fenotipo de la línea 220 es resultado de modificaciones en el contenido de este metabolito.

Es importante señalar que la presencia de trealosa en las líneas transgénicas no evitó el retraso del inicio de la etapa reproductiva en condiciones de sequía, efecto ampliamente documentado en arroz, debido a que esta etapa es la más sensible al estrés hídrico (Osuna 2001). También es interesante la observación que en condiciones de crecimiento sin estrés se ve ligeramente afectado el ciclo de desarrollo de las líneas transgénicas, puesto que en condiciones control se ve retrasado el inicio de la etapa reproductiva. En las líneas

transgénicas derivadas de Morelos A98, todas las líneas se mantuvieron en la etapa de emergencia de panícula evento que marca el inicio de la etapa reproductiva; la variedad de secano Temporalero A95 parece ser más tolerante a la acumulación de trealosa en este aspecto, dado que no se observó una afectación en el ciclo de desarrollo en relación al control. Los efectos negativos sobre el crecimiento y desarrollo de la planta son bien conocidos; según estudios efectuados por Sharma y Kumar (1989), la reducción en el área de las hojas, materia seca y altura de la planta sometida a períodos de sequía, se debe a que el alargamiento celular es muy sensible a las variaciones de humedad en el suelo, disminuyendo el crecimiento. Estudios realizados por el IRRI (1987), indican que las características del tallo y la raíz poseen una estrecha relación con la resistencia a la sequía. Yamagata (1997) expone que hay una estrecha relación directa entre la morfología de la hoja y la tolerancia al estrés, de aquí su asociación positiva con el rendimiento. Por otra parte, ha sido demostrado que algunos procesos morfológicos y fisiológicos pueden ser mantenidos en alto rango como resultado de un ajuste osmótico, en este caso la producción de trealosa en condiciones de estrés; como por ejemplo el mantenimiento de la conductancia estomática y rangos de fotosíntesis relativamente altos (Jones y Rawson, 1979); mantenimiento del crecimiento de hoja, hipocótilo y raíz (Cutler et al. 1980; Sharp y Davies, 1979) en comparación con plantas sin ajuste osmótico. De acuerdo con varios autores (Gesch et al. 1992, Khanna y Chopra 1999, Sen-Gupta y Berkowitz 1987), se ha señalado que el ajuste osmótico probablemente le permita sobrevivir y terminar su ciclo de vida a la planta, pero no necesariamente a tener un mayor rendimiento bajo estrés. Babu et al. (1999) señalan que el aporte positivo del ajuste osmótico al rendimiento está condicionado al largo del período de desecamiento del suelo. Blum et al. (1999) señala que el aporte del ajuste osmótico al rendimiento, se manifiesta de manera indirecta como por ejemplo, generando un mayor crecimiento de raíces con capacidad de explorar un mayor área de suelo. Es importante mencionar, que la eficiencia de selección basada en el rendimiento es relativamente baja y que las interacciones genotipo ambiente tiene efectos mayores en el proceso (Austin 1989). Otros componentes como la duración del ciclo y crecimiento de la planta, son factores que poseen alta heredabilidad y pueden ser empleados como criterio de selección para tolerancia a la sequía más eficientemente según Richard (1989). De aquí que el conocimiento de los procesos fisiológicos que influyen en el rendimiento bajo sequía pueden facilitar la selección mediante el uso de caracteres indirectos como el metabolismo de trealosa.

Efecto de la inhibición de trealasa sobre la resistencia a sequía. La tolerancia a la sequía en las especies de cultivo está asociada al grado en que éstas regulan el contenido de agua y el potencial hídrico foliar durante el estrés. La capacidad de una planta para mantener su estado hídrico a medida que el potencial hídrico del suelo disminuye constituye una adaptación al déficit hídrico (Acevedo et al. 1998), y esta capacidad se refleja en el CRA, en el potencial de solutos (ψ_s) de los tejidos y en el ajuste osmótico. El CRA (Barrs y Weatherley 1962) es la expresión más usada para medir el nivel de agua de un tejido, es una medida del contenido de agua del tejido respecto del total de agua que éste puede almacenar, se expresa como porcentaje y permite conocer el estado hídrico de la planta, por lo que en este trabajo fue un indicativo importante para la determinación de grado de resistencia a la sequía. En arroz para la discriminación de variedades resistentes a sequía el enrollamiento de la hoja es un factor visual fácilmente evaluado y ampliamente utilizado que varía con el grado de tolerancia del genotipo y está controlado por un gen simple recesivo y puede ser localizado en el cuarto cromosoma. (Loresto et al. 1976), un grado pequeño de enrollamiento es tomado

como un indicativo de una gran capacidad de evitación de deshidratación por el desarrollo de raíces profundas y este es un indicativo del potencial de agua en hoja (Jones, 1979). Anteriormente que plantas acumuladoras de trealosa aumentan su tolerancia a estrés abiótico (Cortina et al. 2005, Garg et al. 2002, Goddijn et al. 1999, Pilon-Smits et al. 1998, Romero et al. 1997), sin embargo no se ha reportado que la inhibición de trealasa incrementa la tolerancia a estrés hídrico por lo que se procedió a analizar el grado de tolerancia en condiciones de invernadero. El efecto observado en la variedad Morelos A98 bajo el tratamiento de sequía en líneas transgénicas fue una mayor resistencia a estrés observado por la disminución de nivel de enrollamiento de hoja; hojas de la planta control sufrieron enrollamiento total de sus hojas (nivel 4) con un 50% de CRA (Figura 33). Todas las líneas transgénicas derivadas de la variedad Morelos A98 mostraron un menor nivel de estrés (ubicados entre el 2 y 3) y mayor contenido de CRA que el control, pero sólo las líneas 76 y 75 con una diferencia estadística respecto a la eficiencia de mantenimiento de CRA aún en condiciones de estrés (Figura 33). Una línea interesante lo fue la 226 la cual a pesar de su bajo CRA no mostró señales de estrés evidente (perdió agua rápidamente de la misma manera que el control pero a diferencia de éste no hubo enrollamiento de hojas); esta línea así mismo no mostró acumulación significativa de trealosa en raíz respecto al control, es probable que la acumulación del azúcar se llevara a cabo en otra parte de la planta lo que le confirió protección al estrés. En la variedad Temporalero A95 fueron discretos los efectos de protección debido a que se presentaron relativamente altos niveles de estrés en líneas transgénicas (Figura 38). La línea 144 no conservó el CRA eficientemente y desarrolló enrollamiento de hoja al igual que el control. La línea 220 con fenotipo de baja altura y conservó de manera más eficiente el CRA de hoja y mostró el mejor nivel de resistencia, aunque no fue alta la concentración de trealosa en raíz es probablemente que el contenido de trealosa en hoja lo que le confiere la resistencia a sequía así como el fenotipo observado. La línea 126 a pesar del alto contenido de trealosa en raíz mostró un nivel 3 de estrés. Sin embargo no se presentaron diferencias significativas de CRA en condiciones de sequía respecto a las condiciones control, por lo que es posible que la acumulación de trealosa en líneas transgénicas no tuviera efecto adicional en la eficiencia de retención de agua genotipo-independiente, al observar un comportamiento similar de plantas control y líneas en condiciones de sequía.

Tomando en cuenta lo anterior el CRA de un genotipo resistente a la sequía debiera tener valores altos a pesar del avance del estrés hídrico, lo que le permitiría a la planta mantener la turgencia (ψ_p) (Gesch et al. 1992) y los procesos que de ella dependen. El efecto adaptativo de enrollamiento de hoja en arroz, minimiza la pérdida de agua por transpiración durante déficit de agua (O'Toole et al. 1979) sin embargo cuando ocurre enrollamiento de hoja se reduce el intercambio gaseoso y la intercepción de luz lo cual reduce la fotosíntesis. El efecto de un ajuste osmótico que retrase el enrollamiento de la hoja es una respuesta fisiológica que en forma colectiva ayuda al mantenimiento de funciones celulares en condiciones de baja disponibilidad de agua en hoja. Hsiao et al., (1984) demostró que el grado de enrollamiento de la hoja indica la capacidad del arroz de entrar en ajuste osmótico y ocurre un retardo de la respuesta de enrollamiento de hoja en condiciones de bajo potencial de agua, esto permite mantener el intercambio gaseoso manteniendo la fotosíntesis de la misma manera que retarda la senescencia y muerte de la hoja en condiciones de sequía permitiendo recuperarse una vez que se restituye el agua a la planta. Es probable que después de haber aplicado el estrés de sequía las plantas transgénicas que mostraron mayor nivel de estrés mostraran mejor

capacidad de hidratación que las plantas control una vez que hubiera sido restituido el nivel de agua a las plantas como se han visto las plantas sobre-productoras de trealosa (Cortina et al. 2005, Garg et al. 2002, Goddijn y van Dunn 1999, Pilon-Smits et al. 1998, Romero et al. 1997). Así mismo existe la posibilidad de la interacción con otros factores ambientales como la temperatura principalmente lo que pudiese haber influido en el comportamiento del enrollamiento de la hoja dado que existen múltiples factores que influyen el estatus hídrico de la planta (Ortiz et al. 2003).

Capacidad fotosintética de líneas transgénicas de arroz acumuladoras de trealosa. En trabajos anteriores se han reportado efectos opuestos del efecto de la acumulación de trealosa sobre la fotosíntesis. Garg et al. (2002) reportó una alta tasa de fotosíntesis de arroz expresando coordinadamente los genes *otsA/otsB* bajo condiciones de estrés, sugiriendo que la trealosa es la responsable de la alta capacidad fotosintética por la disminución del daño fotooxidativo causado por el estrés. Karim et al. (2007) propone que el cloroplasto puede ser importante en la tolerancia a sequía debido que la acumulación localizada de trealosa incrementa significativamente la tolerancia probablemente por la protección de proteínas relacionadas a estrés presentes en cloroplasto. Pellny et al. (2004) demostró que es posible la modificación de la fotosíntesis a través del metabolismo de trealosa y que las alteraciones de la capacidad fotosintética se encuentran más relacionadas al contenido de T6P que a los niveles de trealosa. Sin embargo, la gran capacidad fotosintética, estrechamente relacionada a la cantidad y actividad de Rubisco, no se tradujo en crecimiento mayor o biomasa; esto debido a que fue negativamente relacionada al área foliar; en contraste, el crecimiento y biomasa fueron relacionados positivamente.

En arroz la capacidad fotosintética entre las variedades Morelos A98 y Temporalero A95, mostró una diferencia significativa, siendo mayor la fotosíntesis llevada a cabo por la variedad de secano Temporalero A95 en condiciones control, sin embargo el tratamiento de sequía afectó esta actividad de manera importante (Figura 39); el mismo comportamiento se observó en la variedad Morelos A98 (Figura 34), resultado del efecto de un bajo CRA y enrollamiento de hoja. En las líneas transgénicas 71 y 75 derivadas de Morelos A98 que mostraron los mayores niveles de acumulación de trealosa en condiciones de estrés, mostraron una mejora en la capacidad fotosintética en condiciones control y la sequía no afectó su actividad (Figura 34); es posible que la trealosa acumulada en raíz haya proporcionado la capacidad de retención de agua evitando los daños provocados por la sequía. En las líneas 76 y 226 que no presentaron acumulación significativa de trealosa, se observó un incremento significativo en la fotosíntesis. En las líneas transgénicas 220 y 144 derivadas de Temporalero A95 presentan una disminución significativa de la tasa de fotosíntesis en relación a las plantas control en condiciones de riego, contrario de la línea 126 que presenta una significativa mayor capacidad fotosintética relacionada con la mayor acumulación de trealosa en raíz (Figura 38), como se ha visto también en la variedad M98. Sin embargo, las líneas 220 y 144 expuestas a sequía conservan significativamente la actividad fotosintética en condiciones control, contrario a lo que se observa en la línea 126 la cual disminuye los rangos de actividad a la par que el control. La pérdida de actividad fotosintética en esta variedad, se explica con un bajo CRA observado y un nivel de enrollamiento de hoja alto contrario a lo observado en líneas de la variedad Morelos A98.

Parámetros de conductancia y resistencia estomática. En estudio realizado por Tsunoda (1997), expone que las plantas de arroz poseen un elevado número de estomas por unidad de área comparado con el trigo y el maíz; aunque más pequeños. Sin embargo en condiciones de estrés hídrico, la conductancia estomática es regulada acorde a la respuesta varietal al estrés por sequía. Las variedades de secano poseen menor número de estomas, menor apertura e inferior conductancia estomática (Tsunoda y Fukoshima, 1986), por lo que es positivo que las plantas resistentes a sequía sean menos sensibles a la síntesis y translocación del ácido abscísico en condiciones de secano y presenten resistencia estomática superior.

En líneas transgénicas de ambas variedades se obtuvieron mayores niveles de conductancia estomática que plantas control. El mantenimiento de la conductancia estomática en condiciones de sequía de las líneas transgénicas constituye un aporte positivo a la capacidad fotosintética y no limita la fotosíntesis como ocurre en plantas control. Es posible que este comportamiento sea explicado por un mayor número de estomas y la regulación de estos bajo estrés hídrico. Karim et al (2007) reporta que plantas transgénicas productoras de trealosa contienen de 20 a 30% más que plantas silvestres, por lo que el cierre estomático no limita la fotosíntesis en condiciones de sequía; asimismo, sugiere que el metabolismo de trealosa afecta el desarrollo de células guarda y posiblemente también afecta su respuesta a sequía. Es posible que el metabolismo de trealosa este fuertemente implicado en la función estomática dado que el gen *TPS1* de *Arabidopsis* responde fuertemente a la señalización por ABA en células guarda (Leonhardt et al. 2004), Este aspecto se sumaría a las diversas funciones que el metabolismo de trealosa desarrolla en respuesta al estrés abiótico.

Uso del metabolismo de la trealosa como marcador bioquímico en el mejoramiento genético del arroz. El análisis detallado de los datos del metabolismo de la trealosa, así como el comportamiento fisiológico bajo condiciones de estrés hídrico de plantas silvestres de la variedad tolerante y sensible a sequía, permitió obtener evidencia para proponer el uso como marcador bioquímico en el mejoramiento genético del arroz. En los programas de mejoramiento tradicional, no se han asociado características fenotípicas o fisiológicas directamente con la tolerancia a sequía y aún no se conocen las bases genéticas que controlan la tolerancia a sequía en arroz. Recientemente, se han identificado QTL's relacionados a sequía (Li y Xu 2007) para ser utilizados como marcadores de selección, sin embargo debido a la complejidad del carácter el proceso es lento debido a un gran número de QTL's identificados. En este trabajo se encontró que el contenido de trealosa de plantas bajo sequía fue incrementado significativamente solo la variedad Temporalero A95, tolerante a sequía además de cambios en los niveles de sacarosa y almidón. La actividad trealasa es alta en la variedad tolerante a sequía Temporalero A95, en relación a la variedad Morelos A98. Además se observó un incremento en la capacidad fotosintética en Temporalero A95 observada bajo condiciones de estrés hídrico, la cual fue acompañada de baja resistencia estomática y mejor capacidad de retención de agua ambas también bajo estrés. La información bioquímica obtenida del metabolismo de la trealosa junto con características fisiológicas y morfológicas relacionadas a la tolerancia a sequía, puede ser utilizada como marcador de selección en el proceso de mejoramiento genético del arroz. Los ensayos tradicionales utilizados para medir la tolerancia a sequía pueden ser reforzados por la lectura de la actividad trealasa, contenido de trealosa o inducción específica de los genes TPP/TPS bajo condiciones de estrés como marcadores del nivel de adaptación a estrés abiótico en arroz.

La estrategia utilizada en este trabajo no modificó la capacidad natural de la planta de sintetizar trealosa, ya que solo se trató de evitar su degradación y con ello su acumulación. Teóricamente no se esperaban cambios importantes en los niveles de T6P y por lo tanto no debiesen existir efectos detrimentales en el crecimiento y desarrollo de la planta como ocurrió en ambas variedades, obteniendo en general plantas de fenotipo normal sin afectaciones importantes en su ciclo de vida. La acumulación de trealosa se observa básicamente en condiciones de sequía, anteriormente se ha reportado que los genes TPS y TPP son inducibles por estrés, y es en estas condiciones cuando es posible observar el efecto de la inhibición de la trealasa sobre la resistencia a sequía. En el genotipo Morelos A98 la inhibición de la trealasa proporcionó a la planta una mejor tolerancia a la sequía manteniendo la turgencia en condiciones de estrés; en tanto que en las líneas transgénicas de la variedad Temporalero A95 mostró efectos discretos dado que no se evitó el desarrollo de signos de estrés como el enrollamiento de hoja principalmente. Los mecanismos evaluados en los que tuvo efecto positivo la presencia de trealosa fue el mantenimiento del CRA en hoja conservando la turgencia y con ello los procesos fotosintéticos. Las diferencias encontradas en este trabajo indican que el metabolismo de trealosa y en particular la actividad trealasa en raíz tiene una relación en la resistencia a sequía en variedades de arroz de secano (Temporalero A95) y consecuentemente en la adquisición de resistencia en plantas sensibles (Morelos A98). Existe una tendencia de niveles de alta actividad trealasa en raíces de plantas resistentes a sequía, lo que refleja la capacidad de regular el metabolismo de la trealosa. Es probable que existan niveles “permitidos” por la planta para la acumulación de trealosa para un crecimiento normal dado que es posible que exista una modulación de la actividad trealasa en condiciones de estrés. Sería importante investigar si existe una relación directa entre la capacidad de regulación de metabolismo de trealosa en especial la actividad trealasa y la resistencia a déficit hídrico. Así también es interesante investigar la existencia de un mecanismo de regulación de la actividad trealasa en condiciones de estrés hídrico y como se ven afectados los niveles de T6P por esta enzima. Los efectos de la inhibición de trealasa y con ello acumulación de trealosa de la plantas de arroz generadas, corrobora la existencia de un papel importante del metabolismo de trealosa en los mecanismos regulatorios del crecimiento de la planta, así como en el metabolismo y la tolerancia a estrés.

CONCLUSIONES

1. La inhibición por antisentido disminuye la actividad trealasa en líneas transgénicas de arroz.
2. Las condiciones de sequía inducen la acumulación de trealosa en líneas transgénicas de manera significativa.
3. Líneas transgénicas del genotipo Temporalero A95 presentan los mayores niveles de acumulación de trealosa en raíz.
4. La acumulación de trealosa en líneas transgénicas de la variedad Temporalero A95 induce una mayor producción de biomasa foliar y radicular en condiciones de riego y sequía.
5. La acumulación de trealosa retrasa el inicio de etapa reproductiva en líneas transgénicas de Morelos A98 y no en líneas de Temporalero A95 evidenciando la distinta tolerancia a la acumulación de trealosa.
6. La capacidad fotosintética en líneas transgénicas es mayor que plantas de tipo silvestre.
7. La inhibición de la actividad trealasa incrementa la tolerancia a sequía en arroz.

LITERATURA CITADA

- Acevedo E, Silva H, Silva P (1998) Tendencias actuales de la investigación en la resistencia al estrés hídrico de las plantas cultivadas. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Boletín Técnico. 49: 1-28
- Adams RP, Kendall E, Karta KK (1990) Comparison of free sugar in growing and dissected plants of *Selaginella lepidophylla*, Biochemical Systematics and Ecology. 18: 107-110.
- Aeschbacher RA, Müller J, Boller T, Wiemken A (1999) Purification of the trehalase GMTRE 1 from soybean nodules and cloning of its cDNA: GMTRE is expressed at a low level in multiple tissues. Plant Physiol. 119, 489-496.
- Aldemita RR, Hodges TK (1996) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *japonica* and *indica* rice varieties. Planta 199:612-617
- Alexander R, Alamillo JM, Salamini F, Bartels D (1994) A novel embryo specific barley cDNA clone encodes a protein with homologies to bacterial glucose and ribitol dehydrogenase. Planta. 192: 519-525.
- Alia S (1993) Suppression in mitochondrial electron transport is the prime caused behind stress induced proline accumulation. Biochem Biophys Común. 193: 54-58.
- Alfonso R; Martí F, Iglesias J (1986) Estudio del comportamiento de líneas y variedades de arroz (*Oryza sativa*) bajo condiciones de secano. Cienc. Téc. Agric. Arroz . 9 (2).
- Anselmino O, Gilgo E (1993) Über das Vorkommen von Trehalose in *Selaginella lepidophylla*. Ber Deut Pharm Ges. 23: 326-330.
- App H, Holzer H (1989) Purification and characterization of neutral trehalase from the yeast ABYS1 mutant. J. Biol. Chem., 264, 17583-17588.
- Armenta SJL (1981) Dialed analysis of root characteristics in rice (*Oryza sativa*). Tesis (PhD). University of Philippines.
- Arrandea MA (1989) Breeding strategies for drought resistance. In: Drought Resistance in Cereals. Baker FWG (Ed). Published for ICSU press by CAB International. 221, pp. 107-116.
- Asahina E, Tanno KS (1964) A large amount of trehalose in a frost-resistant insect. Nature. 204, pp 1222.
- Asano N, Tkeuchi M, Kameda Y, Matsui K, Kono Y (1990) Trehalase inhibitors, validoxylamine A and related compounds as insecticides. J Antibiot 43: 722-726.
- Austin RB (1989) Maximising crop. Production in water-limited environment. In drought resistance in cereals edited by FWG Baker. Published for ISCU Press by CAB International. 13-26.
- Avonce N, Leyman B, Mascorro-Gallardo JO, Van Dijck P, Thevelein JM, Iturriaga G (2004) The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. Plant Physiol 136: 3649–3659.

- Babu R, Safiullah M, Blum A, Nguyen H (1999) Comparison of measurement methods of osmotic adjustment in rice cultivars. *Crop Science*. 39: 150-158.
- Bae H, Herman E, Bailey B, Bae H-J, Sicher R (2005) Exogenous trehalase alters *Arabidopsis* transcripts involved in cell wall modification, abiotic stress, nitrogen metabolism and plant defense. *Physiologia Plantarum*. 125, 114-126.
- Bae H, Herman E, Sicher R (2005) Exogenous trehalosa promotes non-structural carbohydrate accumulation and induces chemical detoxification and stress response proteins in *Arabidopsis thaliana* grown in liquid culture. *Plant Sci* 168: 1293–1301.
- Barrs HD, Weatherley PE (1962) A reexamination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Australian Journal of Biological Science* 15: 413-428.
- Banaroudj N, Lee DH, Goldberg AL (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *Journal of Biological Chemistry* 276: 24261–24267.
- Bashor MK, Hague E, Das RU, Miah NM (1991) Relationship of flag area to yield, filled grains for panicle and panicle length in upland rice varieties. *Newsletter*. 16(2) p. 12.
- Bell W, Sun W, Hohmann S, Wera S, Reinders A, De Virgilio C, Wiemken A, Thevelein JM (1998) Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J Biol. Chem.* 273: 33311-33319.
- Belocopitow E, Maréchal LR (1970) Trehalose phosphorylase from *Euglena gracilis*. *Biochim Biophys Acta*. 198(1):151–154.
- Bennett JM, Sinclair TR, Muchow RC; Castillo SR (1987) Dependence of stomatal conductance on leaf water potential. Turgor in field-ground Soybean and maize. *Crop. Science*. 27(5) 984-88.
- Bennet M, Bellini C, Van Der SD (2005) Integrative biology: dissecting cross-talk between plant signaling pathways. *Physiol. Plant*. 123, 109
- Bhaskaran S, Smith R (1990) Regeneration in Cereal Tissue Culture: A Review. *Crop Sci*. 30: 1328-1336.
- Bhattacharjee DD, Ramakrishnayya G, Rand SC (1971) Physiological basis of drought conditions. *Oryza*. 8(2):61-68.
- Birch GG (1963) Trehalose. *Advances in carbohydrate Chemistry*. Vol. 18, pp. 201-225.
- Blázquez MA, Santos E, Flores CL, Martínez-Zapater JM, Salinas J, Gancedo C (1998) Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J* 13: 685–689.
- Blum A, Zhang J, Nguyen H (1999) Consistent differences among wheat cultivars in osmotic adjustment and their relationship to plant production. *Field Crops Research*. 64: 287-291.
- Bohnert HJ, Jensen RG (1996) Strategies for engineering water stress tolerance in plants. *Trends Biotechnol*. 14, 89–97.
- Boyer JS (1968) Relationship of water potential to growth of leaves. *Plant Physiol*. 43: 1056-1062
- Brennan PJ, Nikaïdo H (1995) The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem*, 64, 29-63.

- Brenner WG, Romanov Ga, Kolimer I, Burkie L, Schumulinh T (2005) Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive process and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *Plant J.* 44:314-333.
- Bredan ER, Hudgues HF (1973) Effects of Moisture deficits on C14. Translocation in corn (*Zea mays* L.). *Plant Physiology* 52(5) 436 – 439.
- Briens M, Larher F (1983) Sorbitol accumulation in plantaginaceae: further evidence for functions in stress tolerance; *Z. Pflanzenphysiol.* 110 447–458.
- Broodmann D, Schuller A, Ludwig-Müller J, Aeschbacher R, Wiemken A, Boller T, Winkler A (2002) Induction of Trehalase in *Arabidopsis* Plants Infected With the Trehalose-Producing Pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Mol Plant-Microbe Interaction.* 693-700.
- Cabrera PJJ, Lopez L, Assad GN, Medina AC, Bailey MAM, Herrera EL (1997) An efficient particle bombardment system for the genetic transformation of asparagus (*Asparagus officinalis* L.) *Plant Cell Rep*, 16, 255-260.
- Carballo AR (2006) I Curso de capacitación para el mejoramiento genético del arroz. La Habana Cuba.
- Castrillo M (1992) Sucrose metabolism in bean plants under water deficit. *J. Exp. Bot.* 43 1557–1561.
- Capell T, Bassie L, Christou P (2004) Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *PNAS.* 101 (26):9909-14.
- Chen S, Hajirezaei M, Peisker M, Tschiersch H, Sonnewald U, Bornke (2005) Decreased sucrose-6-phosphate phosphatase level in transgenic tobacco inhibits photosynthesis, alters carbohydrate partitioning and reduces growth. *Plant.* 221: 479-492.
- Chida N (1993) Morphological and Physiological aspects of fundamental characters in rice plant. Japan International Cooperation Agency. Isukuba. International Agricultural Training Cueter. 90 p.
- Clegg JS. Evans DR (1961) The physiology of blood trehalosa and its function during flight in the blowfly. *Journal of Experimental Biology.* 38, 771 – 792.
- Clegg JS (1965) The origin of trehalosa and its significance during the formation of encysted dormant embryos of *Artemia salina*. *Comparative Biochemistry and Physiology.* 14, 135-143.
- Colaco CALS, Rosser B (1995) Trehalose– a multifunctional additive for food preservation. *Food Packaging and Preservation.* Blackie Professional, London, pp 123-140.
- CONACYT: El Arroz de Temporal (1982) Investigaciones Sobresalientes. México. Pp 270.
- Cortina C, Culiáñez-Maciá FA (2005) Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science* 169, 75-82.
- Coruzzi GM, Bush DR (2001) Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants; *Plant Physiol.* 125 61–64.
- Cortina C, Culiáñez-Macia FA (2005) Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science* 169 75-82.
- Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM, Anchordoguy TJ (1990) Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology.* 27, 219-231.

- Crowe JH, Crowe LM (2000) Preservation of mammalian cells—learning nature's tricks. *Nature Biotechnology*. 18, 145-147.
- Cutler JM, KW Shahan, PL Steponkus (1980) Influence of water deficits and osmotic adjustment on leaf elongation in rice. *Crop Science*. 20: 314-318.
- Chan MT, Lee TM, Chang HH (1992) Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Physiol*. 33: 577- 583.
- Chang TT; Loresto GC; O'Toole JC, Armenta Soto JL (1983) Strategy and methodology of breeding rice for drought prone areas. In: *Drought resistance in crops with emphasis on rice*. IRRI. Los Baños, Philippines. 324, 217-244.
- Chang TT, Loresto GC (1986) Varietal Improvement for drought resistance in upland rice. IRRI. Los Baños. Philippines. 45.
- Chary SN, Hicks GR, Choi YG, Carter D, Raikhel NV (2008) Trehalose-6-Phosphate Synthase/Phosphatase Regulates Cell Shape and Plant Architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. 146, 97-107.
- Chinnusamy V, Xiong L, Zhu JK (2005) Use of Genetic Engineering and Molecular Biology Approaches for Crop Improvement for Stress Environments. En: Ashraf, M. y P. Harris (eds.). *Abiotic stresses plant resistance through breeding and molecular approaches*. Food Products Press, Binghamton. pp 47- 95.
- Chou IT, Chen CT, Kao CH (1991) Characteristics of the induction of proline accumulations by abscisic acid and isobutyric acid in detached rice leaves. *Plant Cell Physiol*. 32: 269-272.
- Christou P, Ford TF, Kofron M (1991) Production of transgenic rice (*Oryza sativa*) plants from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology*. 9: 957-962.
- Da Silva B, Guimaraez E (1990) Índice de área foliar e produtividade de arroz de sequeiro. *Pesq. Agropec. Brasília*. 25(6):863- 872.
- Da Silva Beatriz S, Steinmets LF, Stone y Guimaraez EP (1985) Tipo de planta, regime hídrico e produtividade do arroz de sequeiro. *Pesq. Agropec. Brasileira*. Brasília. 20(1): 87-95.
- Datta SK (1981) *Principles and Practices of Rice Production*. John Wiley & sons. Singapur. 146-172.
- Datta SK, Seshu DV (1982) Evaluating rices for drought tolerance using field screening and multilocation testing. In: *Drought resistance in crops with emphasis on rice*. IRRI. Los Baños, Philippines. 324. pag 245-263.
- Datta SK, Peterhans A, Datta K, Potrykus I (1990) Genetically engineered fertile Indica-rice recovered from protoplasts. *Bio/Technology*. 8: 736-740.
- Datta K, Koukolikova-Nicola N, Oliva BN, Datta SK. (2000) *Agrobacterium*-mediated engineering for sheath blight resistance of indica rice cultivars from different ecosystems. *Theor. Appl. Genet*. 100: 832-839.
- Datta K, Tu JM, Oliva N, Ona I, Velazhahan R, Mew TW, Mutthukrishan S, Datta SK (2001). Enhanced resistance to sheath blight by constitutive expression of infected related-rice chitinase in transgenic elite indica rice cultivars. *Plant Science*. 405-414.
- De Rayssae (1988) Amelioration varietale du riz pluvial an Brazil. CNPAF. EMBRAPA. Annual Reports. pp 93-105.
- De Virgilio C, Hottinger T, Dominiguez J, Boller T, Wiemken A (1994) The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. *Eur. J. Biochem*. 219, 179-186.

- Delauney AJ, Verma DPS (1993) Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.* 4, 215–223.
- Dellamora-Ortiz GM, Ortiz, CHD, Maia, JCC, Panek AD (1986) Activity and stability of a *Rhizomucor miehei* lipase in hydrophobic media. *Arch. Biochem. Biophys.* 205-214.
- Demel RA, Dorrepaal E, Ebskamp MJM, Smeekens S, de Kruijff B (1998) Fructans interact strongly with model membranes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1375, 36–42.
- Donnamaria MC, Howard EI, Grigera JR (1994) Interaction of water with α , α -trehalose in solution: molecular dynamics simulation approach. *Journal of the Chemical Society Faraday Transactions.* 90, 2731–2735.
- Drennan PM, Smith P, Goldsworthy D, van Staden J (1993) The occurrence of Trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus febellifolius* Welw. *J. Plant Physiol.* 142:493- 496.
- Easting JD (1983) Physiological Aspects of High Temperature and water stress in Raper, C.D (ed) *Crop Reactions to water at temperature stress in Humid Temperate Climates*. Boulder: Westview Press P. 89-113.
- Eastmond PJ, van Dijken AJ, Spielman M, Kerr A, Tissier AF, Dickinson HG, Jones JD, Smeekens SC, Graham IA (2002) Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *Plant J. Jan;* 29(2):225-35.
- El-Bashiti T, Hamamci H, Öktem HA, Yücel M (2005) Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. *Plant Science.* 169, 47 -54.
- Ehness R, Ecker M, Godt DE, Roitsch TH (1997) Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell.* 9:1825–1841.
- Ekanayake IJ, Garrity DP, Masajo TM, O'Toole JC (1985) Root pulling resistance in rice: inheritance and association with drought tolerance. *Euphytica.* 34:905-913.
- Elbein AD, Mitchell M (1973) Levels of glycogen and trehalose in *Mycobacterium smegmatis* and the purification and properties of the glycogen synthetase. *Journal of Bacteriology.* 113, 863-873.
- Elbein AD (1974) The metabolism of α -trehalose. *Adv. Carbohydr. Chem.* 30: 227-256.
- Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Review. Glycobiology.* Vol. 13 no.4 pp 17R-27R.
- Fageria R (1984) Adubacao e Nutricao mineral da cultura de Arroz. EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Arroz. EFEJAO. EDIT. Cane0peen, pag 117-137.
- FAO (2008) Comunicado de Prensa, Roma:FAO (<http://www.fao.org/newsroom/es/>)
- Franks F (1990) Freezing drying: from empiricism to predictability. *Cryoletters.* 11, 93-110.
- Franquet B, Borràs P (2006) *Economía del arroz: Variedades y mejora*, www.eumed.net/libros/2006a/
- Frison M, Parrou JL, Guillaumot D, Masquelier D, Francois J, Chaumont F, Batoko H (2007) The *Arabidopsis thaliana* trehalase is a plasma membrane-bound enzyme with extracellular activity. *Febs Lett.* 581(21): 4010-6
- Fritzius T, Aeschbacher R, Wiemken A, Winkler A (2001) Induction of ApL3 expression by trehalose complements the starch-deficient *Arabidopsis* mutant *adg2-1* lacking ApL1, the large subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Plant Physiology* 126, 883–889.

- Gajri PR, Prihar SS (1983) Effect of small irrigation amounts on the yield of wheat. *Agricultural water management*. 6:31-41.
- Gamez EA, Cabrera PJJ, Herrera EL, Hernández LC, Montes de Oca LR (2004) Mejora del Crecimiento de Plantas de Tabaco Mediante la Inhibición del Gen de la Trealasa. *Ciencia UANL. Año/Vol. VII. Número 4*. pp. 483-489.
- García AB, de Almeida EJ, Iyer S, Gerats T, van Montagu M, Caplan AB (1997) Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. *Plant Physiol* 115: 159- 319.
- Garg AK, Kim JK, Owens ThG, Ranwala AP, Choi YD, Kochian LV, Wu RJ (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Nat Acad Sci*. 99 (25): 15898-15903.
- Ge LF, Chao DY, Shi M, Zhu MZ, Gao JP, Lin HX (2008) Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene *OsTTP1* confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. *Planta*. 228: 191-201.
- Gesch R, Kenefick D, Koepke A (1992) Leaf water adjustment and maintenance in hard red winter wheat. *Crop Science* 32: 180-186.
- Goddijn O, Smeekens S (1998) Sensing trehalose biosynthesis in plants. *Plant J*. 1998 Apr;14 (2):143-6.
- Goddijn O, Dun KV (1997) Trehalose metabolism in plants, *TIPS*. 4 (8) 315-319.
- Goddijn O, Verwoed T, Voogd E, Krutwagen R, de Graaf P, Poel J, van Dun K, Ponstein AS, Damm B, Pen J. (1997) Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol*. 113: 181-190.
- Gomez LD, Baud S, Graham IA (2006) The role of trehalosa-6-hosphate synthase en *Arabidopsis* embryo development. *Biocehm. Soc. Trans*. 33. 280- 282.
- Godt DE, Roitsch T (1997) Differential regulation of a tomato invertase gene family suggests an important function of extracellular isoenzymes in establishing and maintaining sink metabolism; *Plant Physiol*. 115 273–282.
- Gupta P, O'Toole JC (1986) Upland rice, global perspective. *IRRI*, 149.
- Gupta AK, Kaur N (2005) Fructan metabolism in Jerusalem artichoke and chicory. In *Carbohydrate reserves in plants – Synthesis and regulation*. Gupta AK, N Kaur (eds) The Netherlands: Elsevier Science. pp 223–248
- Gupta AK, Narinder K (2005) Sugar signaling and gene expression in relation to carbohydrate metabolism under abiotic stresses in plants. *Review. J. Biosci*. 30(5),761- 776.
- Hardie DG (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 774–785
- Hare PD, Cress WA, van Staden J (1998) Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant Cell Environ*. 21 535–554.
- Heenan DP, Thompson IA (1984) Growth grain yield and water use of rice grain under restricted water supply in new south wales. *Australian Journal Exp. animal Husbandry* Vol. 24 P. 104-109.
- Hei Y, Ohta S, Komari T, Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J*. 6: 271-282.
- Henckel PA (1964) Physiology of plants under drought. *Ann. Rev. Plant physiol* 15: 363-386.

- Hernández LA, Távitas L (1991) Mejoramiento de la planta de arroz para la eficiencia en el uso del agua. VIII Conferencia Internacional de Arroz para América Latina y el Caribe. Villa Hermosa Tabasco México p. 55-78.
- Hincha DK, Hellwege EM, Heyer AG, Crowe JH (2000) Plant Fructans stabilize phosphatidylcholine liposomes during freeze-drying; *Eur. J. Biochem.* 267 535–540
- Holmstrom KO, Mantyla E, Welin B, Mandal A, Palva ET (1996) Drought tolerance in tobacco. *Nature.* 379: 683-684.
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q, Xiong L (2006) Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice *PNAS* August 29, 2006 vol. 103 no. 35 12987-12992
- Hsiao TC, O'Toole JC, Yambao EB, Turner NC (1984) Influence of Osmotic Adjustment on Leaf Rolling and Tissue Death in Rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Physiol* 75, 338-341.
- Hu H, Dai M, Yao J, Xiao B, Li X, Zhang Q, Xiong L (2006) Overexpression of NAF, ATAF and CUC (NAC) transcription factors enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *PNAS.* 103: 12987-12992.
- Hu H, You J, Fang Y, Zhu X, Qi Z, Xiong L (2008) Characterization of transcription factor gene SNAC2 conferring cold and salt tolerance in rice. *Plant Mol Biol.* Feb 14.
- Huang Y, Xiao B, Xiong L (2007) Characterization of a stress responsive proteinase inhibitor gene with positive effect in improving drought resistance in rice. *Planta.* 226(1):73-85.
- Ignacimuthu S, Arockiasamy S. Terada R (2000) Genetic transformation of rice: Current status and future perspectives. *Curr Sci.* 79:186-196.
- Ingram KT; Bueno FD, Namuco OS, Yambas EB, Beyronty CA (1994) Rice root Traits for drought resistance and their genetic variations. In *Rice roots nutrient and water use. Selected Papers from the International rice research conference IRRI- 90.* Pag. 67-77.
- IRRI (1987) Drought stress index for rice. In: *Annual Report for 1986.* Los Baños. Laguna. Philippines. 120-123
- IRRI (1998) *Rice Almanac.* Manila, The Philippines: International Rice Research Institute.
- IRRI (1993) *Research Programs upland rice ecosystem.* Los Baños, Laguna, Philippines. 97-118.
- Iwasa T, Higashide E, Yamamoto H, Shibata M (1971) Studies on validamicins, new antibiotics. II. Production and Biological properties of validamicins A and B. *J. Antibiot* 24: 107-113.
- Jain RK (1997) Effects of some factors on plant regeneration from *Indica* rice cells and protoplasts. Review. *Indian J. Exp. Biol.* 35:323-331.
- Jang JC, Sheen J (1994) Sugar sensing in higher plants. *Plant Cell.* 6, 1665–1679
- Jang ICh, Oh SJ, Seo J-S, Choi WB, Song SI, Kim ChH, Kim YSh, Seo HS, Choi YD, Nahm BH, Kim JK (2003) Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol.* 131: 516-524.
- Jensen, CR, Hensen, JE, Turner NC (1989) Leaf gas exchange and water relations during drought induce stomatal closure. *Australian Journal of Plant Physiology* 16: 14-25.

- Jha KP, Sahov N (1988) Influence of various water regimens on yield attributes of rice under Mahanabi delta conditions. *Oryza* 25(1):32-37.
- Jin Su, Wu R(2004) Stress-inducible synthesis of proline in transgenic rice confers faster growth under stress conditions than that with constitutive synthesis *Plant Science*. 166, pp 941-948.
- Jones HG (1979) Visual estimation of plant water status in cereals. *J. Agric Sci* 92:83-89.
- Jones NM, Rawson HM (1979) Influence of rate of development of leaf water deficits upon photosynthesis, leaf conductance, water use efficiency, and osmotic potential in sorghum. *Physiology Plant* 45:103-111.
- Kandror O, DeLeon A, Goldberg AL. (2002) Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 9727±9732.
- Kanneganti V, Gupta AK (2008) Overexpression of OsiSAP8, a member of stress associated protein (SAP) gene family of rice confers tolerance to salt, drought and cold stress in transgenic tobacco and rice. *Plant Mol Biol. Mar*; 66(5):445-62.
- Karaba A, Dixit S, Greco R, Aharoni A, Trijatmiko KR, Marsch-Martinez N, Krishnan A, Nataraja KN, Udayakumar M, Pereira A (2007) Improvement of water use efficiency in rice by expression of HARDY, an *Arabidopsis* drought and salt tolerance gene. *PNAS*. pp 15270-15275.
- Karim S, H Aronsson H, Ericson H, Pirhonen M, Leyman B, Welin B, Mantyla E, Palva T, Van Dijck P, Holmström KO (2007) Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalosa. *Plant Mol Biol*. 64:371–386
- Kasperbauer MJ, Bausscher WJ (1991) Genotypic differences in cotton root penetration of a compacted subsoil. *Crop. Sci*. 31: 1376-1378.
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999) Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotechnol* 17:287–291.
- Kaur S, Gupta AK and Kaur N (2000) Effect of GA3, kinetin and indol acetic acid on carbohydrate metabolism in chickpea seedlings germinating under water stress; *Plant Growth Regul*. 30: 61–70.
- Kawai H, Sakurai M, Inoue Y, Chujo R, Kobayashi S (1992) Hydration of oligosaccharidae. Anomalous hydration ability of trehalosa. *Cryobiology*. 29, 599-606.
- Keller F, Schellenberg M, Wiemken A (1982) Localization of trehalase in vacuoles and of trehalase in the cytosol of yeast. *Arch. Microbiol*. 131, 298-301.
- Kendall EJ, Adams RP, Kartha KK (1990) Trehalase activity in plant tissue cultures. *Phytochemistry*. 119, 489-496.
- Khanna, Chopra R (1999) Osmotic adjustment and yield stability in wheat genotypes and species grown in water limited environments. *Journal of Plant Biology* 26: 173-178.
- Kim S, Kang JY, Cho DI, Park JH, Kim SY (2004) ABF2, an ABRE binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *Plant J* 40:75–87.
- Koch KE (1996) Carbohydrate modulated gene expression in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol*. 47 509–540

- Kohli A, Ghareyazic B, Kim HS, Khush GS, Bennet J (1996) In Proceedings of the 3rd International Rice Genetics Symposium. Khush GS (Ed). International Rice Research Institute, Los Baños, Philippines. Pp. 825–828.
- Kolbe A, Tiesen A, Schluepmann H, Paul M, Ulrich S, Geigenberg P (2005) Trehalose-6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of a ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102: 11118-11123.
- Kono Y, Takeda S, Kameda Y, Takahashi M, Matsushita K, Nishina M, Hori E (1993) Lethal activity of a trehalase inhibitor, validoxylamina A, and its influence on the blood sugar level in *Bombix mori* (Lepidoptera: Bombycidae). *Appl Entomol Zool.* 28: 379-386
- Kramer PJ (1983) Water relations of plant. Academic Press. 489.
- Krishnamurthy R, Bahagwat KA (1989) Polyamines as modulators of SALT tolerance in rice cultivars. *Plant Physiol* 91: 500-504.
- Kyozuka J, Otoo E, Shimamoto K (1988) Plant regeneration from protoplast of *indica* rice: genotype differences in culture response. *Theor. Appl. Genet.* 76:887-890.
- Larque S (1977) Apuntes del metabolismo del agua en las plantas. Rama de Botánica. Colegio de postgraduados. Chapingo. México
- Lasso R (1991) Contribución de un programa de Mejoramiento Genético de Arroz para el agricultor de subsistencia. VIII Conferencia Internacional de Arroz para América Latina y el Caribe. Villa Hermosa. Tabasco. México p. 40-54.
- Lederer E (1976) Cord factor and related trehalose esters. *Chem. Phys. Lipids*, 16, 91-106.
- Leslie SB, Israelí E, Lighthart B, Crowe Jh, Crowe JH, Crowe LM (1995) Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Appl Environ Microbiol* 61: 3592-3597.
- Leonhardt N, Kwat JM, Robert N, Waner D, Leonhardt G, Schroeder JI (2004) Microarray expression analyses of *arabidopsis* guard cells and isolation of recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell.* 16:596-615.
- Leyman B, Avonce N, Ramon N, Van Dijck P, Iturriaga G, Thevalein JM (2006) Trehalose-6-phosphate synthase as an intrinsic selection marker for plant transformation. *Journal of Biotechnology.* 21, 309-317.
- Li ZK, Xu JL (2007) Breeding of drought and SALT tolerance rice (*Oryza sativa* L.): Progress and Perspectives. In: Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM (eds). *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*, Springer Verlag. 531-536.
- Lilley JM, Fukai S (1994) Effects of timing and severity of water deficit on four diverse rice cultivars. III. Phenological development, crop growth and grain yield. *Field Crops Res.* 37; 225-234.
- Lin YJ, Zhang Q (2005) Optimizing the tissue culture conditions for high efficiency transformation of *indica* rice. *Plant Cell Rep.* 12: 250-255.
- Lingappa BT, Sussman AS (1959) Endogenous substrates of dormant, activated and germinated ascospores of *Neurospora tetrasperma*. *Plant Physiol.* 34, 466.
- Liu K, Wang L, Xu Y, Chen N, Ma Q, Li F, Chong K (2007) Overexpression of OsCOIN, a putative cold inducible zinc finger protein, increased tolerance to chilling, salt and drought, and enhanced proline level in rice. *Planta.* 226 (4):1007-16.

- Liu F, Vantoai T, Moy LP, Bock G, Linford LD, Quackenbush J (2005) Global transcription profiling reveal comprehensive insights into hypoxic response in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 137:1115-1129.
- Loescher WH, Tyson RH, Everard JD, Redgwell RJ, Bieleski RL (1992) Mannitol synthesis in higher plants. Evidence for the role and characterization of a NADPH-dependent mannose-6-phosphate reductase. *Plant Physiol* 98: 1396-1402.
- Londesborough J, Varimo K (1984) Characterization of two trehalases in baker's yeast. *Biochem. J.* 219, 511-518.
- Loresto GC, Chang TT, Tagumpay O (1976) Field evaluation and breeding for drought resistance. *Philipp J Crop Sci*: 36-39.
- Lowlar DW, Day W, Johnston AE, Leggs BJ, Parkinson KJ (1981) Growth of spring barley under drought. Crop development, photosynthesis, dry matter accumulation and nutrient content. *Journal Agric. Sci. Camb.* 96: 167-86.
- Ludlow MM, Muchow RC (1990) A critical evaluation of traits for improving crop yields in water-limited environments. *Adv Agron.* 43: 107-153.
- Lunn JE, Feil R, Hendriks JH, Gibon Y, Morcuende R, Osuna D, Scheible WR, Carillo P, Hajirezaei MR, Stitt M. (2006) Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are correlated with redox activation of ADPglucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* 397,139–148.
- Ma HM, Gu M, Liang GH (1987) Plant regeneration from cultured immature embryos of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *Theor. Appl. Genet.* 73: 389-394.
- Martínez TM, Cabrera P, Herrera EL (2003) Improvement of rice transformation using bombardment of calli derived from scutellum. *Plant Mol Biol Rep.* 21:429-437
- Masle J (1992) Genetic Variation in the effects of root impedance on the growth and transpiration rates of wheat and Barley. *Aust. J. Plant. Physiol.* 19:109-125
- Matthews MA, Boyer JS (1984) Acclimation of Photosynthesis to low leaf under Potentials. *Plant Physiolol.* 74 (1): 161-166
- McBride MJ, Ensing JC (1987) Effects of intracellular trehalosa content on *Streptomyces griseus* spores. *Journal of Bacteriology.* 169, 4995-5001
- McWilliam JR (1989) The dimensions of drought. In Baker FWG. *Drought resistance in Cereals.* ICSU, Paris. 1-11
- Miranda JA, Avonce N, Suárez R, Thevelein JM, Van Dijck P, Iturriaga G (2007) A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 226 (6) 1411-21.
- Morgan JM (1989) Physiological traits for drought resistance. In: *Drought Resistance in Cereals.* Baker FW (Ed). Published for ICSU Press by CAB. International. 221 pp.53-64.
- Morrish F, Sionstand DD, Armstrong CL, Fromm M (1993) Microprojectile bombardment: a method for the production transgenic cereal crop plants and the functional analysis of genes. In : A Hiatt (eds) *Tragnsgenic Plants: Fundamentals and applications.* Marcel Dekker, Inc. New York. pp 133-171.

- Muchow KC, Sinclair TR, Bennett JM, Dammond LC (1986) Crop Physiology metabolism responses of leaf growth leaf nitrogen and stomatal conductance to water deficits during vegetative growth of field-grown soybean. *Crop. Science* 26(6): 1190-95
- Müller J, Staehelin C, Boler RB, Wiemken A (1992) Partial purification and characterization of trehalase from soybean nodules. *J. Plant physiol.* 140: 8 -13.
- Müller J, Boller T, Wiemken A (1995) Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plants Sci.* 112: 1-9.
- Müller J, Boller T, Wiemken A (1998) Trehalose affects sucrose synthase and invertase activities in soybean (*Glycine max* L.) roots. *Journal of Plant Physiology.* 153; 255-257.
- Müller J, Wiemken A, Aeschbacher RA (1999) Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. *Plant Science.* 147, 37-47.
- Müller J, Aeschbacher RA, Wingler A, Boller T, Wiemken A (2000) Disaccharide-mediated regulation of sucrose: fructan-6-fructosyltransferase, a key enzyme of fructan synthesis in barley leaves. *Plant Physiology.* 123, 265-273.
- Müller J, Aeschbacher RA, Wingler A, Boller T, Wiemken A (2001) Trehalose and trehalase in Arabidopsis. *Plant Physiology.* 125, 1086-1093.
- Murashige T, Skoog F (1972) A revised medium for rapid grow and bioassays with tobacco tissues cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nakashima K, Tran LS, Van Nguyen D, Fujita M, Maruyama K, Todaka D, Ito Y, Hayashi N, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2007) Functional analysis of a NAC-type transcription factor OsNAC6 involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J.* 51(4):617-30.
- Newman Y, Ring SG, Colaco C (1993) The role of trehalose and other carbohydrates in biopreservation. *Biotechnol Genet Eng Rev* 11: 263–294
- Nguyen HT; Ray ID, Long XY (1994) Use of molecular marks to exploit rice root traits for drought tolerance p.81-86. In: Rice Roots nutrient and water use. Selected papers from the International Rice research conference IRRI. 90.
- Nguyen Ht, Babu RC, Blumm A (1997) Breeding for drought resistance in rice: Physiology and molecular genetic considerations. *Crop Science.* 37: 1426-1434.
- Nwaka S, Mechler, B, Holzer H (1996) Detection of the ATH1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. *FEBS Lett.*, 386, 235-238.
- Oh SJ et al (2005) Arabidopsis CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth. *Plant Physiol* 138:341–351.
- Oh SJ, Kwon CW, Choi DW, Song SI, Kim JK (2007) Expression of barley HvCBF4 enhances tolerance to abiotic stress in transgenic rice. *Plant Biotechnol J.* (5):646-56.
- Ortiz M, Silva H, Silva P, Acevedo E (2003) Estudio de parámetros hídricos foliares en trigo (*Triticum aestivum* L.) y su uso en selección de genotipos resistentes a sequía. *Revista Chilena de Historia Natural.* 76: 219-233.
- Osombi O (1984) Water stress on leaf and root growth and water of gmelina ascorea RO x B. Seedlings. *Biología plantarum* 26(4): 246-52.

- Osuna CFJ (2001) Fundamentos de la Producción de Arroz. INIFAP-CIRC. Campo Experimental "Zacatepec". Folleto Científico No. 1. Morelos, México. Pp.66.
- O'Toole JC, Chang IT (1979) Drought resistance in cereals-rice: a case of study. In: Musell H, Staples RC (Eds). Stress physiology in crops plants. J Wiley and Sons, New York. 373-405.
- O'Toole JC, Cruz RT, Singh TN (1979) Leaf rolling and transpiration. *Plant Science Lett* 16:111-114.
- Paul M, Pellny T, Goddijn O (2001) Enhancing photosynthesis with sugar signals. *Trends Plant Sci* 6: 197-200.
- Pelleschi S, Guy S, Kim J Y, Pointe C, Mahe A, Barthens L, Leonardi A, Prioul J L (1999) IVR2, a candidate gene for a QTL of vacuolar invertase activity in maize leaves. Gene specific repression under water stress; *Plant Mol. Biol.* 39 373-380.
- Pellny TK, Ghannoum O, Conroy JP, Schluepmann H, Smeekens S, Andralojc J, Krause KP, Goddijn O, Paul MJ (2004) Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. *Plant Biotechnology J* 2: 71-82
- Pilon-Smits EAH, Terry N, Sears T, Kim H, Zayed A, Hwang S, van Dun K, Verwoerd ThC, Krutwagen RW, Goddijn OJM (1998) Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *J. Plant. Physiol.* 152: 525-532.
- Plipo M, Allahverdiyeva Y, Paakkanen V, Suoranta UM, Battchikova N, Aro EM (2006) Chloroplast mediated regulation of nuclear genes in *Arabidopsis thaliana* in the absence of light stress. *Physiol Genomics.* 25: 142-152.
- Pramanik MH, Imai R (2005) Functional identification of a trehalose-6-phosphate gene that is involved in transient induction of trehalose biosynthesis during chilling stress in rice. *Plant Mol. Biol.* 58: 751-762.
- Price J, Laxmi A, Martin SK, Jang JC (2004) Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in *Arabidopsis*; *Plant Cell* 16 2128-2150.
- Raineri DM, Bottino P, Gordon MP, Nester EW (1990) *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.) *Bio/Technology.* 8: 33-38.
- Ramírez E, Alfonso R, Alemán L, Mosses A, Rodríguez S (1991) Influencia de la falta de la lámina de agua en diferentes fenofases sobre la duración del ciclo en 3 variedades de arroz de ciclo medio y 3 de ciclo corto I parte. *Agrotécnica de Cuba* 23(1-2): 41-46.
- Ramon M, Rolland F, Thevelein JM, van Dijck P, Leyman B (2007) ABI4 mediates the effects of exogenous trehalose on *Arabidopsis* growth and starch breakdown. *Plant Mol. Biol.* 63: 195-206.
- Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, Hinata K (1996) Transgenic plant production mediated *Agrobacterium* in Indica-rice. *Plant Cell Rep.* 15: 727- 730.
- Richards RA (1989) Breeding for drought resistance physiological approaches in: Drought resistance in cereals. Edited by FWG. Baker Published for ICSU Press by CAB International. 65-79.
- Richards AB, Krakowka S, Dexter LB, Schmid H, Wolterbeek APM, Waalkens-Berendsen DH, Shigoyuki A, Kurimoto M (2002) Trehalose: a review of properties, history of use and human tolerance, and results of multiple safety studies. *Food and Chemical Toxicology.* 40, 871-898.
- Rimmele M, Boss W (1994) Trehalose-6-phosphate hydrolase of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 176(18):5654-64.
- Robson G, Kuhn P, Trinci A (1989) Effect of validamycin A on the inositol content and branching of *Rhizotonia cerealis* and other fungi. *J Gen Microbiol.* 134:3184-3194.

- Roitsch T, Bittner M, Godt DE (1995) Induction of apoplastic invertase of *Chenopodium rubrum* by D-glucose and a glucose analogue and tissue-specific expression suggest a role in sink-source regulation; *Plant Physiol.* 108 285–294.
- Rolland F, Baena GE, Sheen J (2006) Sugar sensing and signaling in Plants: Conserved and Novel mechanism. *Review. Annu. Rev. Plant Biol.* 57:675–709.
- Romero C, Belles JM, Vaya JL, Serrano R, Culiñaez MFA (1997) Expression of the yeast trehalose-6-phosphatase synthase gene in transgenic tobacco plants: Pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta.* 201: 293-297.
- Sato Y, Yokoya S (2008) Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Rep.* 27(2):329-34.
- Satoh-Nagasawa N, Nagasawa N, Malcomber S, Sakai H, Jackson D (2006) A trehalose metabolic enzyme controls inflorescence architecture in maize. *Nature.* Vol 441: 227-230.
- Schick I (1995) Trehalose phosphorylase from *Pichia fermentans* and its role in the metabolism of trehalose. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 1088–1095
- Schluepmann H, Pellny T, van Dijken A, Smeekens S, Matthew P (2003) Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6849–6854.
- Schluepmann H, van Dijken A, Aghdasi M, Paul M, Smeekens S (2004) Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol* 135: 879–890.
- Schluepmann H, Paul M (2009) Trehalose metabolites in *Arabidopsis* – elusive, active and central. In: *The Arabidopsis Book.* American society of Plant Biologists.
- Scott DA, Greinwald JH Jr, Marietta JR, Drury S, Swiderski RE, Vinas A, DeAngelis MM, Carmi R, Ramesh A, Kraft ML, Elbedour K, Skworak AB, Friedman RA, Srikumari Srisailapathy CR, Verhoeven K, Van Camp G, Lovett M, Deininger P, Batzer MA, Morton CC, Keats BJ, Smith RJH, Sheffield VC (1998) Identification and mutation analysis of a cochlear expressed, zinc finger protein gene at the DFNB7/11 and dn hearing-loss-loci on human chromosome 9q and mouse chromosome 19. *Gene* 215:461–469
- Seki M, Narusaki M, Ishida J, Nanjo T, Fujita M, Oone Y, Kamiya A, Nakajima M, Enju A, Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Taji T, Shinozaki KY, Carninci P, Kawai J, Hayashizaki KY, Shinozaki K (2002) Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high salinity stresses using a full length cDNA micro array; *Plant J.* 31 279–292.
- Sharma DK, Kumar A (1989) Effect of water stress on plant water relations and yield of varieties of Indian Mustard (*Brassica Juncea* Sup. sp. *Juncea*) *Ind. J. Agric. Sci.* 59(5): 281-85.
- Sharp RE, Davies WJ (1979) Solute regulation and growth by roots and shoots of water-stressed maize plants. *Planta* 147: 43-49.
- Shen B, Jensen RG, Bohnert HJ (1997) Mannitol protects against oxidation by hydroxyl radicals. *Plant Physiol.* 115:1211-1219.
- Shima S, Matsui H, Tahara S, Imai R (2007) Biochemical characterization of rice trehalose-6-phosphate phosphatases supports distinctive functions of these plant enzymes. *FEBS Journal.* 274:1192–1201.
- Singer MA, Lindquist S (1998) Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the yin and yang of trehalose. *TIB Tech.* 16, 460-468.

- Singh T, Singh Habirand, Naik DS (1986) Effect of water stress at three stages of growth on water use and water use efficiency of wof wheat. *Indian Journal plant physiology* VXXIX p. 248-255.
- Sivamani E, Shen P, Opalka N, Beachy RN, Fauquet CM (1996) Selection of large quantities of embryogenic calli from *Indica* rice seeds for production of fertile transgenic plants using the biolistic method. *Plant Cell Rep.* 15, 322–327.
- Smeekens S (2000) Sugar-induced signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 49–81.
- Smith AM, Zeeman SC (2006) Quantification of starch in plant tissues. *Nature Protocols* 1, 1342 – 1345.
- Stambuck BU, de Arujo PS, Panek AD, Serrano R (1996) Kinetics and energetics of trehalose transport in *Saccharomyces cerevesiae*. *Eur. J. Biochem.* 237, 876±881.
- Stitt M, Krappe A (1999) The interaction between elevated carbon dioxide and nitrogen nutrition. The physiological and molecular background. *Plant Cell Environ.* 22 583–621.
- Stoop JMH, Pharr DM (1994) Growth substrate and nutrient salt environment after mannitol to hexose partitioning in celery petioles. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 119 237–242.
- Talukder MSU (1987) Growth and development of wheat as affected by soil moisture stress. *Ind. J. Agric. Sci.* 57(8): 559-64.
- Taji T, Qhsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K and Shinozaki K (2002) Important roles of drought-and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 29 417–426.
- Tavitas FL (1981) Evaluación y selección de genotipos para resistencia a sequía y determinación de proteína en el grano de arroz de secano. Tesis Profesional. Escuela de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Morelos Cuernavaca Mor.
- Tavitas FL (1986) Informe Anual del Programa de Mejoramiento de Arroz para resistencia a sequía y a *Piricularia oryzae*. Zacatepec. Mor. México 60 p.
- Tavitas FL (1987) Necesidades hídricas de la planta de arroz. Trabajo presentado en el curso sobre Producción de Arroz en el Trópico Húmedo de México. INIFAT-CIAT Campeche Camp. México 30 p.
- Tavitas FL, Hernández A (2000) Catalogo de Variedades que actualmente se cultivan en México. INIFAP-CIRC Campo Experimental “Zacatepec”. Publicación Especial No. 4. Morelos, México. 56
- Tejera GN, Iribarne C, Lóopez M, Herrera-Cervera JA, Lluch (2005) Physiological implications of trehalase from *Phaseolus vulgaris* root nodules: partial purification and characterization. *Plant Physiol Biochem.* 45:355-361.
- Thevelein JM (1984) Regulation of trehalose metabolism in fungi. *Microbiol. Rev.*, 48, 42-59.
- Thimm O, Blasing O, Gibon Y, Nagel A, Meyer S, Kruger P, Selbing J, Müller LA, Rhee SY, Stitt M (2004) MAPMAN: a user-driven tool to display genomic data sets on to diagrams of metabolic pathways and other biological process. *Plant J.* 37:914-939.
- Thomashow MF (1999) Plant cold accumulation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.* 50 571–599.
- Tofiño A, Romero HM, Cevallos H (2007) Efecto del estrés abiótico sobre la síntesis y degradación del almidón. Una revisión. *Agronomía Colombiana.* 25(2): 245-254.

- Tomes DT, Ross MC, Songstad DD (1995) Direct DNA transfer into intact Plant Cells Via Microprojectile Bombardment. En: Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods, Springer Lab Manual. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany. Gamborg, OL., Phillips, GC. (Eds). 197-213.
- Toriyama K, Arimoto Y, Uchimiya H, Hinata K (1998) Transgenic rice plants alter direct gene transfer into protoplasts. *Bio/Technology*. 6. 1072-1074.
- Tsunoda S (1997) Dry matter productivity and yielding hability. In Science of plant. Volume three Genetics.
- Tanake M et al. (Eds) Food and Agriculture Policy Research Center Tokyo pag. 368 - 400
- Uchimiya H, Fuskimi T, Hashimoto H, Harda H, Syono K, Sugawara Y (1986) Expression of a foreign gene in callus derived from DNA-treated protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen.* 16, 204–207.
- Valdez M, Cabrera PJL, Sudhakar DE, Herrerra EL, Christou P. 1998. Transgenic Central America, West African and Asia elite rice varieties resulting from particle bombardment of foreign DNA into mature seed-derived explants utilizing three different bombardment devices. *Annals of Botany*. 82: 795-801.
- van Dijken AJ, Schlupepmann H, Smeekens SC (2004) *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiol* 135: 969–977
- van Dijk P, Colavizza D, Smet P, Thevelein JM (1995) Differential importance of trehalosa en stress resistance in fermenting and no fermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Applied Enviromental Microbiology*. 61, 109-115.
- van Solingen P, van der Plaat JB (1975) Partial purification of the protein-system controlling the breakdown of trehalose in baker's yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 62, 553±560.
- Vargas JP (1985) El arroz y su medio ambiente. In: Arroz: Investigación y Producción. CIAT. Cali, Colombia. pp.19-35.
- Vasil V, Vasil IK (1980) Isolation and culture of cereal protoplasts II. Embryogenesis and plantlet formation from protoplasts of *Pennisetum americanum*. *Theor. Appl. Genet.* 56: 97-99.
- Vasil IK (1994) Molecular improvement of cereals. *Plant Mol. Biol.* 25: 925-937.
- Vereyken IJ, Chupin V, Demel RA, Smeekens S, de Kruijff B (2001) Fructans insert between the headgroups of phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta* 1510 307–320.
- Vinod S, Yadav RC, Yadav NR, Chapagain BP (2004) High frequency plant regeneration from desiccated calli of *indica* rice (*Oryza sativa* l.). *African Journal of Biotechnology* Vol. 3 (5), pp. 256-259.
- Voinnet O, Baulcombe DC (1997) Systemic signalling in gene silencing. *Nature*. 389: 553.
- Vogel G, Aeschbacher RA, Müller J, Boller T, Wiemken A (1998) Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast tps2 mutant. *Plant J.* 13, 673-683.
- Vogel G, Fiehn O, Jean-Richard-dit-Bressel L, Boller T, Wiemken A, Aeschbacher RA, Winkler A (2001) Trehalose metabolism in *Arabidopsis*: ocurrence of trehalose and molecular cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase homologues. *Journal Exp. Bot.* 52, 1817-1826.
- Wade LJ (1996) Soil compaction-make it or break it for rainfed lowland ecosystem. In G Kirchhof and HB So (eds). Managemen of clay solis in the rainfed lowland rice.based cropping systmen. ACIAR Proceedings Number 70, Canberra. 243-247.

- Wanner L A and Junttila O (1999) Cold-induced freezing tolerance in *Arabidopsis*; *Plant Physiol.* 120 391–399
- Wang R, Okamoto M, Xing X, Crawford NM (2003) Microarray analysis of the nitrate response in *Arabidopsis* roots and shoots reveals over 1,000 rapidly responding genes and new linkages to glucose, trehalose-6-phosphate, iron, sulfate metabolism. *Plant Physiol.* 132: 556-567.
- Wingler A, Fritzius T, Wiemken A, Boller T, Aeschbacher RA (2000) Trehalose induces the ADP-glucose pyrophosphorylase gene, *ApL3*, and starch synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 124: 105–114
- Wingler A (2002) The function of trehalose biosynthesis in plants. *Phytochemistry.* 60: 437-440.
- Winkler K, Kienle I, Burgert M, Wagner JC, Holzer H (1991) Metabolic regulation of the trehalose content of vegetative yeast. *FEBS Lett.* 291: 269-272.
- Womersley C, Smith L (1998) Anhydrobiosis in nematodes. 1. The role of glycerol, myo-inositol and trehalose during desiccation. *Comparative Biochemical Physiology.* 70B, 579-586.
- Wyatt GR, Kalf GF (1957) The chemistry of insect hemolymph. II. Trehalose and other carbohydrate. *Journal of General Physiology.* 40, 833-847.
- Xiang Y, Huang Y, Xiong L (2007) Characterization of stress-responsive CIPK genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiol.* 144(3):1416-28.
- Xiao B, Huang Y, Tang N, Xiong L (2007) Over-expression of a LEA gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theor Appl Genet.* 115(1):35-46.
- Xu DQ, Huang J, Guo SQ, Yang X, Bao YM, Tang HJ, Zhang HS (2008) Expression of a TFIIIA-type zinc finger protein gene *ZFP252* enhances drought and salt tolerance in rice (*Oryza sativa* L.). *FEBS Lett.* 582(7):1037-43.
- Xu X, Li B (1994) Fertile transgenic Indica rice plants obtained by electroporation of the seed embryo cells. *Plant Cell Report*, 13, 237-242.
- Yamagata H (1997) Analysis of morphological factors In: *Science of the plant Genetics*. Volume three. Tanaka Matsuo et al (Eds). Food and Agriculture Policy Research Center. 1008: 277–285.
- Yancey P (2001) Water stress, osmolytes and proteins. *American Zoologist.* 41: 699-709
- Yeo ET, Kwon HB, Han SE, Lee JT, Ryu JC, Byu MO (2000) Genetic engineering of drought resistant potato plants by introduction of the trehalose-6-phosphate synthase (*TPS1*) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cells.* 10(3):263–268.
- Yoshida S, Parao FT (1976) Climatic influence on yield and yield components of lowland rice in the tropics. In: *Climate and Rice*. IRRI, Filipinas. pp 471-494.
- Yoshida S, Satake T, Mackill DS (1981) High temperature stress in rice. IRPS No. 67. International Rice Research Institute. P 15.
- Yoshida S (1982) Factores que limitan el crecimiento y los rendimientos del arroz de temporal. En: *Arroz de Temporal*. CONACYT, pp 848-854.
- Young ND (1996) QTL Mapping and Quantitative Disease resistance in Plants. *Annu Rev Phytopathol* 34:479-501

- Zhang HM, Yang H, Rech EL, Golds TJ, Davis AS, Mulligan BJ, Cocking EC (1988) Transgenic rice plants produced by electroporation-mediated plasmid up-take into protoplast. *Plant Cell Rep.* 7,379–381.
- Zhang J, Zheng HG, Ali ML, Tripathy JN, Aarti A, Pathan MS, Sarial AK, Robin S, Nguyen TT, Babu RC, et al. (1999) Molecular dissection of drought tolerance in rice: from physio-morphological traits to field performance. In: O'Toole JC, Ito O, Hardy B (eds), *Genetic Improvement of Rice for Water-Limited Environments*. International Rice Research Institute, pp 331-343.
- Zhang Y, Primavesi LF, Jhurea D, Andralojc PJ, Mitchell RA, Powers SJ, Schluemann H, Delatte T, Winkler A, Paul MJ (2009) Inhibition of SNF1-Related protein kinase 1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 149: 1860-1871.

RESUMEN CURRICULAR

Deyanira Quistián Martínez

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

Tesis: EFECTO DE LA INHIBICION DE LA TREALASA POR RNA ANTISENTIDO
SOBRE LA TOLERANCIA A SEQUIA EN ARROZ (*Oryza sativa* L.)

Campo de Estudio: Biotecnología Vegetal

Datos Personales: Nacida en San Luis Potosí, S.L.P. el 5 de Diciembre de 1979, hija de Elvira
Martínez Camacho y Mario Quistián Martínez.

Formación Académica: Bióloga egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la
Universidad Autónoma de Nuevo León.

Publicaciones. 2

**Editorial Manager(tm) for Molecular Breeding
Manuscript Draft**

Manuscript Number:

Title: **Use of trehalose metabolism as biochemical marker in rice breeding**

Article Type: Manuscript

Keywords: drought tolerance, marker-assisted selection (MAS), rice , trehalose, trehalase.

Corresponding Author: DR JOSE LUIS CABRERA PONCE, PhD

Corresponding Author's Institution: CINVESTAV IPN

First Author: Deyanira Quistián-Martínez, BsC

Authors: **Deyanira Quistián-Martínez**, BsC; Andrés Adolfo Estrada-Luna, PhD; Josué Altamirano, PhD; Juan José Peña-Cabriales, PhD; Roberto Montes de Oca-Luna, PhD; JOSE LUIS CABRERA PONCE, PhD

Abstract: Rice is one of the most important crops worldwide. Abiotic stresses can directly or indirectly affect its physiology status, which may negatively alter overall metabolism. Rice is drastically affected when grown under drought conditions in rain-fed lowland ecosystems. Unfortunately, traits influencing the response of drought tolerance in rice and other crops are controlled by genetic regulation localized in many quantitative trait loci (QTL) so the breeding is a long and complex process. Trehalose accumulation in several plant tissues has correlated with the development of different abiotic stresses including drought tolerance and might be involved in mechanisms of osmoprotection and stabilization of biomolecules. In this study we characterized and analyzed trehalose accumulation and activity and the plant growth in three selected mexican rice genotypes: two drought tolerant (Temporalero A95 and Sabanero A95) and one drought sensitive (Morelos A98) after a drought treatment with the aim to obtain evidences to be used as genetic markers. Our results show that similar trehalose content was found in roots under irrigated conditions among all varieties, however, under drought conditions the synthesis of trehalose was enhanced only in drought tolerant varieties. Additionally, changes in the levels of non-structural sugars accompanied the accumulation of trehalose. Trehalase activity was higher in drought tolerant varieties than the sensitive one. An increased nphotosynthetic capacity in drought tolerant varieties was observed under stress conditions, which was accompanied with lower stomatal resistance and better water holding capacity. We conclude that the information obtained can be used as a marker-assisted selection to drought tolerance with the aim of developing new protocols for genetic improvement in drought tolerance in rice.

Efficient secretion of a modified E7 protein from Human Papilloma Virus type-16 by *Lactococcus lactis*

D. Quistián-Martínez¹, J. Villatoro-Hernández², M.J. Loera-Arias², B.R. Rangel-Colmenero², L.M. Zavala-Flores², J. Sepúlveda-Saavedra², S. Guzmán-López³, R.E. Elizondo-Omaña³, R. Montes-de-Oca-Luna², O. Saucedo-Cárdenas^{2,4*}

¹ Departamento de Bioquímica, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), San Nicolás de los Garza, N.L. México.

² Departamento de Histología, Facultad de Medicina, UANL, Monterrey, N.L. México.

³ Departamento de Anatomía Humana, Facultad de Medicina, UANL, Monterrey, N.L. México.

⁴ División de Genética, Centro de Investigación Biomédica del Noreste, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), Monterrey, N.L. México