



**Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo, A. C.**

**“RESPUESTA FENOTÍPICA DE PLANTAS DE TRIGO  
TRANSFORMADAS CON EL GEN *SCTPS1-TPS2* PARA SÍNTESIS  
DE TREHALOSA”**

---

por:

**I.B. Fabiola Alejandra Cabral Torres**

TESIS APROBADA POR LA

**COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS**

Como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

**Hermosillo, Sonora.**

**Febrero 2014**

## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis del Ing. Fabiola Alejandra Cabral Torres, la han encontrado satisfactoria y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias.

**Dra. Elisa M. Valenzuela Soto**

**Director de Tesis**

**Dra. Marisela Rivera Domínguez**

**Asesor**

**Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez**

**Asesor**

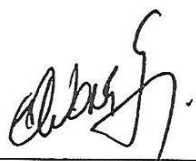
**Dr. Alejandro Castellanos Villegas**

**Asesor**

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en ésta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



---

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. por brindar sus instalaciones.

A la Coordinación de Ciencia de los Alimentos

A mi directora de tesis Dra. Elisa M. Valenzuela Soto por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por su ayuda y disposición para la realización del proyecto.

A mi comité de tesis Dra. Marisela Rivera Domínguez, Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez y Dr. Alejandro Castellanos Villegas por su apoyo y disposición durante la realización del proyecto.

## DEDICATORIAS

Dedico este trabajo primeramente a Dios por todo lo que me ha dado en la vida.

Con mucho cariño dedico este trabajo a mis dos grandes amores, a mi esposo y compañero Juan Manuel Leyva, gracias por impulsarme y creer en mí, a mi pequeño ángel Sofía Valentina, gracias por mostrarme lo mejor de la vida, con tu sonrisa todo vale la pena.

A mis padres María Eugenia Torres Díaz y Martín Cabral Torres a quienes debo todo, gracias por su amor y apoyo incondicional, gracias por estar en cada paso del camino.

A mis hermanos Martín Cabral Torres y Ruth Eugenia Cabral Torres, gracias por sus consejos y por ser un gran modelo a seguir, los admiro hermanos.

A mi gran familia de tíos (a) y primos (a), y en especial a mi tía Martha Torres Díaz que ocupa un lugar especial en mi corazón.

A mis compañeros y amigos Dalia Ríos García y Juan Pablo Valenzuela por brindarme por haber hecho del laboratorio un lugar agradable y por todas las veces que me ayudaron y me hicieron reír. A todas las amistades que he formado en CIAD.



## CONTENIDO

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE CUADROS .....	xii
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
INTRODUCCION .....	1
ANTECEDENTES.....	3
Trehalosa.....	3
Biosíntesis de la Trehalosa.....	7
Trehalosa-6-Fosfato .....	9
Estrés Abiótico en Plantas.....	13
Cambios Fisiológicos y Morfológicos bajo Condiciones de Estrés .....	14
Estrés Hídrico .....	16
Estrés Salino .....	18
Transformación de Plantas con Genes para Síntesis de Trehalosa.....	19
HIPOTESIS.....	23
OBJETIVOS.....	24
Objetivo General.....	24
Objetivos Particulares.....	24
MATERIALES Y METODOS.....	25
Material Biológico .....	25
Esterilización de Material Biológico .....	25
Tiempo de Germinación y Viabilidad de la Semilla.....	26
Obtención de Plantas Maduras .....	26

Tratamiento de Estrés Salino .....26

**CONTENIDO (Continuación)**

Fotosíntesis y Estado del Fotosistema II .....30

Evaluación de la Biomasa Seca .....31

RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... 32

Germinación y viabilidad de la semilla.....32

Fotosíntesis y estado del fotosistema II.....34

Fluorescencia .....54

Evaluación de la biomasa seca .....65

REFERENCIAS ..... 74



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1.	..... E	
	estructura de trehalosa.....	4
2.	.....	
	Mecanismos de protección de trehalosa sobre proteínas. ....	6
3.	..... V	
	ías de síntesis de trehalosa en eucariotes y procariotes.....	8
4.	..... C	
	ontexto funcional de T6P en plantas. ....	11
5.	..... G	
	erminación de semillas RD29A (3 días de imbibición). ....	27
6.	..... P	
	lántulas RD29A en selección con PPT y NaCl. ....	33
7.	..... E	
	fecto del estrés salino en la asimilación de CO <sub>2</sub> en plantas de trigo .....	36
8.	..... A	
	similación de CO <sub>2</sub> de plantas sometidas a estrés salino después de 7 días de recuperación.....	38
9.	..... E	
	fecto del estrés salino en la conductancia estomática (G <sub>s</sub> ).....	40
10.	..... C	
	onductancia estomática (G <sub>s</sub> ) en plantas sometidas a estrés salino después de 7 días de recuperación .....	42
11.	..... E	
	fecto del estrés salino en la transpiración (E).....	44
12.	..... T	
	ranspiración (E) en plantas sometidas a estrés salino después de 7 días de recuperación .....	46

13. ....	E
ficiencia en uso de agua (A/E) durante tratamiento de estrés salino. ....	48
14. ....	E
ficiencia en uso de agua (A/E) en plantas sometidas a estrés salino a los 7 días de recuperación.....	49
15. ....	E
fecto del estrés salino en la concentración de CO <sub>2</sub> intercelular (C <sub>i</sub> ). ....	50
16. ....	C
oncentración de CO <sub>2</sub> intercelular (C <sub>i</sub> ) en plantas sometidas a estrés salino a los 7 días de recuperación.....	52
17. ....	E
ficiencia en la fijación del carbono (A/C <sub>i</sub> ) durante tratamiento de estrés salino.....	53

### **LISTA DE FIGURAS (Continuación)**

18. ....	E
ficiencia en la fijación del carbono (A/C <sub>i</sub> ) en plantas sometidas a estrés salino a los 7 días de recuperación.....	55
19. ....	E
fecto del tratamiento de estrés salino en la eficiencia del PSII (F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub> ) .	56
20. ....	E
fecto en eficiencia del PSII (F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub> ) a los 7 días de recuperación del tratamiento de estrés salino .....	58
21. ....	E
fecto del tratamiento de estrés salino al día 1 en las variables de fluorescencia. ....	60
22. ....	E
fecto del tratamiento de estrés salino al día 3 en las variables de fluorescencia. ....	61
23. ....	E
fecto del tratamiento de estrés salino al día 5 en las variables de fluorescencia. ....	63

24. .... V  
    variables de fluorescencia a los 7 días de recuperación del tratamiento de  
    estrés salino.. .... 64

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. .... T transformaciones de plantas con genes de síntesis de trehalosa ..... 22	T 22
2. .... C composición de medio MSS empleado como medio de selección para plántulas..... 28	C 28
3. .... M micronutrientes y macronutrientes empleados en la solución de Hoagland utilizada para el riego de las plantas de trigo en termolita..... 29	M 29
4. .... P porcentaje y tiempo de germinación de semillas RD29A, 35S y no transformadas y porcentaje de sobrevivencia a PPT de plantas RD29A y 35S..... 35	P 35
5. .... E efecto del estrés salino en la biomasa seca de plantas RD29A y no transformadas. .... 66	E 66

## RESUMEN

La salinidad es el principal factor ambiental que limita el crecimiento y la productividad de los cultivos. Los efectos perjudiciales de alta salinidad en las plantas puede observarse a nivel de la planta completa como muerte o decremento en la productividad. Durante el desarrollo del estrés salino los procesos mayores como la fotosíntesis, síntesis de proteínas y energía y el metabolismo de las grasas se ven afectados. Usualmente las tasas de fotosíntesis son más bajas en plantas expuestas a salinidad principalmente a NaCl. Por otro lado, el trigo siendo uno de los cultivares más importantes a nivel mundial y ampliamente cosechado en el estado de Sonora lo hace un buen modelo de estudio, aunado a los problemas de escasez de agua y suelos salinos en el norte del país. Por ello, es necesario obtener plantas de trigo más tolerantes a estrés salino sin poner en riesgo la producción. En el presente estudio se evaluó la respuesta fenotípica de plantas de trigo transformadas con el gen *ScTPS1-TPS2* para una enzima bifuncional que cataliza la síntesis de trehalosa sometidas a estrés salino con 200 y 400 mM de NaCl. Se trabajó con tres líneas de plantas transformadas con el gen *ScTPS1-TPS2* y un gen que confiere resistencia al herbicida PPT bajo el promotor inducible por estrés RD29A. Se evaluó la fisiología y morfología de las plantas transformadas y no transformadas, así como los efectos del tratamiento de estrés salino en las variables de intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila así como en la biomasa seca de las plantas. Se observó una disminución en las variables de intercambio de gases para plantas no transformadas sometidas a 200 y 400 mM de NaCl así como en la eficiencia cuántica del fotosistema II y una reducción en la biomasa seca total para el tratamiento de 400 mM de NaCl. Las plantas transformadas resultaron tolerantes a la concentración más alta de NaCl (400 mM).

**Palabras clave:** Salinidad, alteraciones fenotípicas, mejoramiento genético, enzima bifuncional.

## ABSTRACT

Salinity is a major environmental factor that limits crops development and productivity. The detrimental effects of high salinity in plants can be observed at the whole plant level as death or decrease in productivity. During the development of high salinity processes such as photosynthesis, protein synthesis energy production and lipid metabolism are affected. Photosynthetic rates are usually lower in plants exposed to NaCl. Wheat is one of the most important crops worldwide and widely produce in the state of Sonora which makes it a good study model, coupled with the problems of water scarcity and saline soil in the north region of the country. Therefore, it is necessary to obtain wheat plants more tolerant to salt stress without compromising production. In the present study the phenotypic response of wheat plants transformed with *ScTPS1-TPS2* gene for a bifunctional enzyme that catalyzes trehalose synthesis under salt stress by 200 and 400 mM NaCl were evaluated. Three lines of plants transformed with *ScTPS1-TPS2* gene under stress inducible promoter RD29A were evaluated. Physiology and morphology of the transformed and untransformed plants, and salt stress treatment effects on gas exchange variables, chlorophyll fluorescence, and dry biomass of plants were evaluated. A decrease in gas exchange and quantum efficiency of photosystem II in untransformed plants subjected to 200 and 400 mM NaCl was observed, and a reduction in the total dry biomass for the treatment of 400 mM NaCl. Transformed plants showed tolerance to high concentrations of NaCl (400 mM).

**Keywords:** Salinity, phenotypic alterations, genetic improvement, bifunctional enzyme.

## INTRODUCCION

El incremento en la población y la reducción en la disponibilidad de los suelos de cultivo son dos amenazas para la sustentabilidad agrícola (Cassman *et al.*, 2003). La acumulación de sales solubles es la principal razón de la reducción del área de cultivo. Altas concentraciones de sodio ( $\text{Na}^+$ ), cloro ( $\text{Cl}^-$ ), magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ), calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) y bicarbonato ( $\text{HCO}_3^-$ ) en el suelo perturban el crecimiento y desarrollo de las plantas, como última instancia afectan su rendimiento (Shahbaz y Ashraf, 2008; Shahbaz *et al.*, 2011). Aunque los científicos han tenido éxito en cierta medida en la mejora de la tolerancia al estrés en cereales todavía existe un gran potencial de mejoramiento a través de medios bióticos exhaustivos (Araus *et al.*, 2002; Slafer, 2003).

De los diversos enfoques bióticos existentes, el mejoramiento convencional, la selección asistida por marcadores genéticos y enfoques transgénicos son los más viables. La necesidad de mejorar la producción de cereales y crear cultivos tolerantes a la salinidad se ha generado debido a diversas razones, tales como: La producción de cereales no ha aumentado al ritmo registrado entre 1950 y la década de 1990 (Calderini y Slafer, 1998; Conway y Toenniessen, 1999). El consumo de los cereales está aumentando debido a su valor nutricional, sin embargo, el estrés por salinidad afecta directamente su producción y calidad (Pederson *et al.*, 1999). Los factores ambientales adversos tales como salinidad, aumento de temperatura, alta tasa de evapotranspiración y baja precipitación han sido los principales factores de abandonar las tierras de cultivo (Rijsberman y Manning, 2006; Lobell *et al.*, 2008).



En cereales como el trigo se han reportado pérdidas en su rendimiento dado a salinidad moderada en el suelo (Qayyum y Malik, 1988; Shahbaz *et al.*, 2011) y afectaciones severas en su crecimiento (Perveen *et al.*, 2011). Como una opción para contribuir a resolver los problemas de salinidad se cuenta con la ingeniería genética para la introducción de diferentes genes, entre ellos los genes de síntesis de trehalosa. Se han transformado diversas especies de plantas con genes de diferentes orígenes implicados en el metabolismo de trehalosa, las cuales han mostrado tolerancia a la salinidad (Iturriaga *et al.*, 2009). Sin embargo, dichas plantas han presentado cambios morfológicos no deseados, los cuales se han asociado a una elevada síntesis del intermediario trehalosa 6-fosfato (Pilon-Smits *et al.*, 1998; Schluepmann *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009). Siendo el trigo uno de los cultivares más importantes a nivel mundial y ampliamente cosechado en el estado de Sonora lo hace un buen modelo de estudio para generar plantas de trigo transgénicas resistentes a la salinidad debido a los problemas de alta salinidad y escasez de agua en esta región. Además, es importante obtener plantas de trigo más tolerantes a la salinidad sin poner en riesgo la producción. Es por ello, que el objetivo del presente trabajo fue evaluar los cambios morfológicos y fisiológicos que pueden presentar plantas de trigo transformadas con el gen *ScTPS1-TPS2* de síntesis de trehalosa.

## ANTECEDENTES

### Trehalosa

La trehalosa ( $\alpha$ -D-Glucopiranosil,  $\alpha$ -D-glucopiránosido) es un disacárido no reductor en el cual dos moléculas de glucosa están unidas por un enlace glicosídico  $\alpha$ -(1-1) (Figura 1). La trehalosa se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, su síntesis se ha reportado en bacterias, algas, levaduras, hongos e invertebrados (De Virgilio *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 2002; Avonce *et al.*, 2006). También se ha reportado la presencia de los genes y enzimas necesarios para síntesis de trehalosa en algunas plantas superiores, aunque solamente las llamadas “plantas de resurrección” como *Selaginella lepidophylla* son capaces de acumularla (Adams *et al.*, 1990; Drennan *et al.*, 1993; Goddijn y Smeekens, 1998; Müller *et al.*, 2001).

Por muchos años se consideró a la trehalosa como un azúcar poco común porque solo había sido aislada de plantas de resurrección, levaduras y de larvas de algunos insectos. En la actualidad se ha demostrado que este azúcar está presente en un gran número de organismos. El enlace glicosídico que une a las dos hexosas en la molécula de trehalosa es de baja energía (1kCal/mol), lo que la hace una estructura muy estable en comparación con la sacarosa (Crowe *et al.*, 1998).

Tres posibles mecanismos han sido propuestos para explicar la función de trehalosa como protector de biomoléculas: reemplazamiento de agua, estabilidad química y formación de cristales (Green y Angell, 1989; Colaco *et al.*, 1992; Donnamaria *et al.*, 1994). Estos mecanismos no son mutuamente

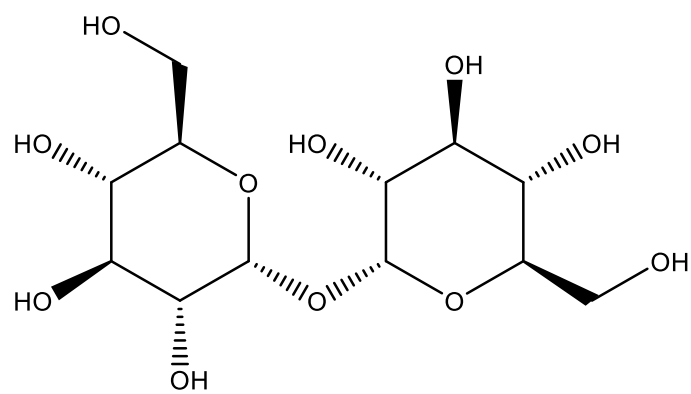


Figura 1. Estructura de trehalosa

excluyentes y todos podrían contribuir a los efectos estabilizadores de la trehalosa. Una característica importante es que la trehalosa es el único azúcar que forma estructuras amorfas cristalinas no higroscópicas y es estable a altas temperaturas, aun cuando el cristal se encuentra en estado anhidro (Crowe *et al.*, 1998).

Todos los azúcares tienen la propiedad de formar cristales, sin embargo, la trehalosa tiene una capacidad mayor debido a su existencia en diferentes formas polimórficas. Además este azúcar posee una temperatura de transición más alta que otros disacáridos. Es por esto que aún bajo temperaturas elevadas, la temperatura de transición de los cristales de trehalosa permanece bajo condiciones de ambiente/almacenamiento, protegiendo a la biomolécula atrapada adentro. Esto le permite a la trehalosa formar un estado vítreo y continuar intacta por tiempos prolongados en comparación a otros azúcares (Figura 2A) (Green y Angell, 1989).

El enlace glicosídico entre los dos residuos de D-glucosa de la trehalosa muestra una gran flexibilidad en comparación con otros disacáridos. Esta propiedad le permite a la trehalosa interactuar con otros grupos polares irregulares de diferentes macromoléculas (Figura 2B) (Donnamaria *et al.*, 1994). La teoría del reemplazamiento de agua sugiere que todas las macromoléculas biológicas son normalmente estabilizadas por el agua, la cual forma puentes de hidrógeno alrededor de las moléculas (capa de hidratación). Se ha propuesto que la trehalosa en solución protege las estructuras ante la pérdida de agua que sucede durante la deshidratación o congelamiento, reemplazando las moléculas de agua en la capa de hidratación (Figura 2C) (Clegg, 1985). Este mecanismo ayuda a estabilizar las biomoléculas e inhibir la desnaturalización irreversible.

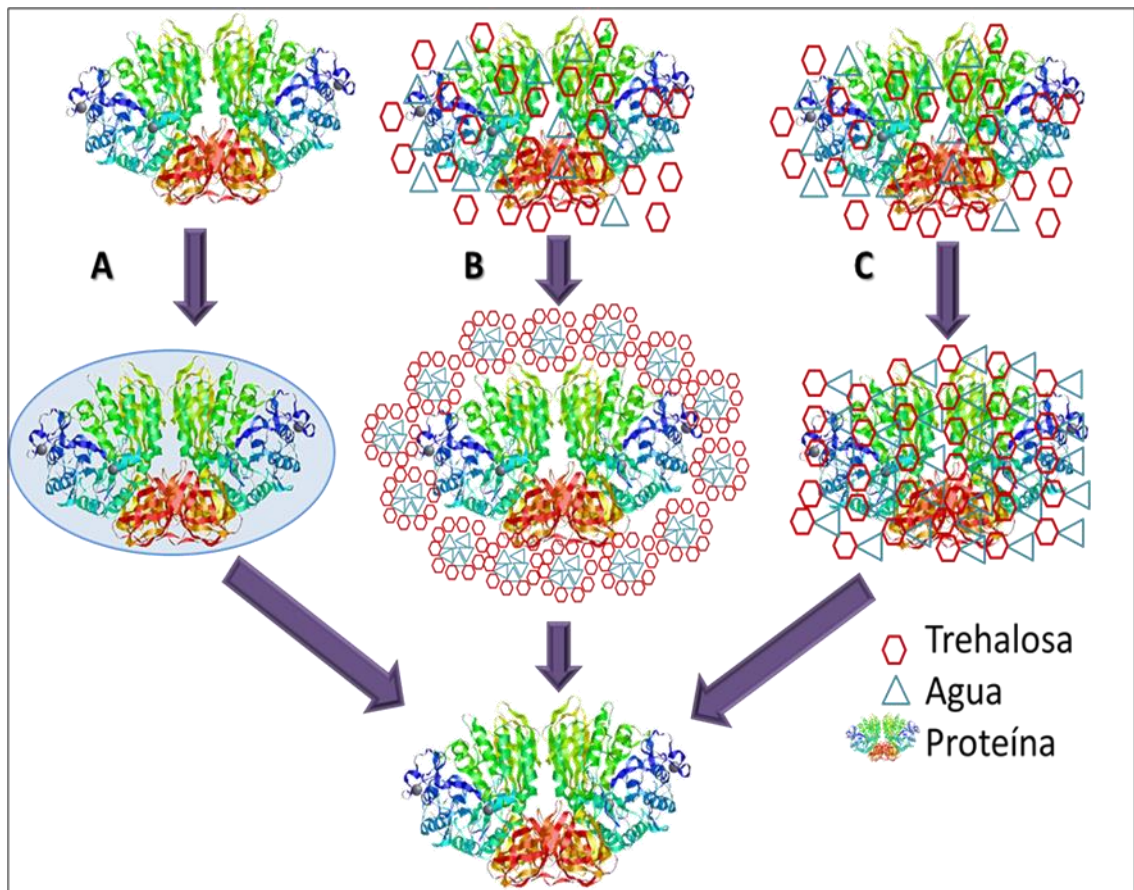


Figura 2. Mecanismos de protección de trehalosa sobre proteínas. A) Teoría de vitrificación, B) Teoría de estabilidad química y C) Teoría de reemplazamiento de agua.

## Biosíntesis de la Trehalosa

A la fecha se han reportado cinco vías para la biosíntesis de trehalosa presente en los tres dominios del árbol de la vida (Figura 3) (Iturriaga *et al.*, 2009). La ruta más común y mejor estudiada entre diversas especies como levaduras, bacterias y plantas involucra dos etapas. La primera etapa es catalizada por la enzima trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) que lleva a cabo la condensación de uridil-glucosa (UDP-glucosa) y glucosa-6-fosfato (G6P) para formar el intermediario trehalosa-6-fosfato (T6P). La segunda etapa es la desfosforilación del intermediario por la enzima trehalosa 6-fosfato fosfatasa (TPP) para formar trehalosa y fosfato inorgánico (Goddijn y Smeekens, 1998). Esta ruta TPS-TPP se encuentra en una gran variedad de organismos como: insectos, plantas de “resurrección” como *Selaginella lepidophylla* y en *Arabidopsis thaliana* (Zentella *et al.*, 1999; Yancey, 2005) *Escherichia coli* (Strom y Kaasen, 1993) y *Saccharomyces cerevisiae* (De Virgilio *et al.*, 1994).

Con el fin de identificar los genes que participan en la biosíntesis de trehalosa en secuencias de genomas completas, se han realizado análisis utilizando buscadores de bases de datos para las secuencias de TPS y TPP (Avonce *et al.*, 2006). Se ha descubierto que eubacteria posee 5 rutas para la biosíntesis de trehalosa y arquea tiene 4 rutas, mientras que para fungi, plantas y metazoa solamente se ha identificado la ruta TPS/TPP. Los dominios de TPS y TPP en procariontes generalmente se encuentran en los operones, mientras que en eucariotes estos dominios han sufrido una evolución paralela al igual que duplicación (Avonce *et al.*, 2006).

En el genoma de *Arabidopsis* hay 11 genes para TPS subdivididos en Clase I (*AtTPS1-5*) y Clase II (*AtTPS5-11*) dependiendo si muestran similitud a levadura TPS1 o TPS2 (Leyman *et al.*, 2001). Sin embargo esta planta acumula niveles insignificantes de trehalosa, se ha demostrado que la única proteína con actividad enzimática es AtTPS1, lo que pone en duda la función de los otros 10 genes. Una tercera familia de genes involucrados en el metabolismo de

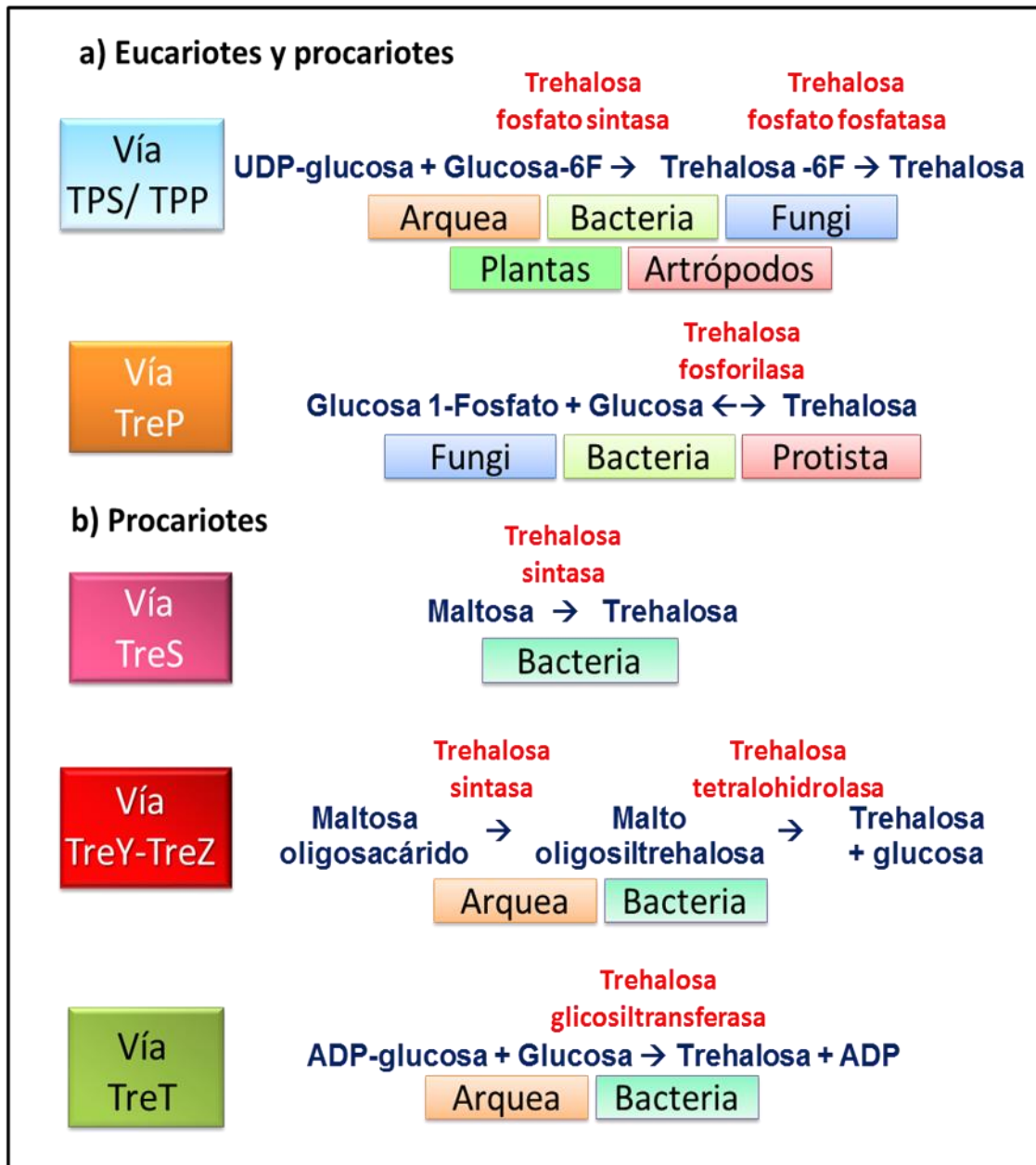


Figura 3. Vías de síntesis de trehalosa en eucariotes y procariotes.

trehalosa en *Arabidopsis* son los de Clase III (*AtTPPA-J*), los cuales muestran homología con las enzimas TPP (Vogel *et al.*, 1998). Las proteínas codificadas de Clase I y II muestran un dominio TPS fundido y parece ser monofilético en comparación con TPP de levadura. Se encontró mediante análisis bioinformático que todos los genes de TPS de plantas (Clase I, II y III) están bajo presión de selección. Lo que sugiere que todos ellos tienen una función particular, que puede estar implicada en otros procesos no necesariamente de osmoprotección (Avonce *et al.*, 2006).

El análisis de los genomas de *Arabidopsis*, arroz y álamo demostró que contienen grandes familias de genes TPS y TPP (Lunn, 2007). Por lo que se demostró que es atípico que contengan cuatro clases I de genes TPS, tres de los cuales (*AtTPS2-4*) codifican isoformas cortas inusuales de TPS que están presentes sólo en los miembros de la familia *Brassicaceae*. Las clases I y II están representadas en los genomas de algas clorofitas y plantas sin flores. Por lo tanto, se sugiere que los genes de TPS de plantas son muy antiguos (Lunn, 2007). Ninguna de las proteínas de *Arabidopsis* de clase II muestra actividad significativa de TPS o TPP en levadura, por lo tanto estas proteínas muestran un rol de reguladores (Ramon *et al.*, 2009). Se cree que las enzimas TPS de Clase II podrían llevar a cabo la función de seguimiento de los niveles de T6P, actuando de este modo como sensores de la disponibilidad de carbohidratos y desencadenar respuestas específicas de los tejidos.

### Trehalosa-6-Fosfato

En años recientes ha emergido un nuevo papel para el intermediario trehalosa 6-fosfato como molécula de señalización en el metabolismo de los carbohidratos y en el desarrollo de las plantas (Paul *et al.*, 2008). Actualmente se tiene evidencia de que la trehalosa 6-fosfato participa en la regulación del metabolismo del carbono, fotosíntesis, germinación y desarrollo de inflorescencias. Por ejemplo en *Arabidopsis* la trehalosa 6-fosfato y



posiblemente también la proteína AtTPS1 participan en la señalización de glucosa y ácido abscísico durante el desarrollo vegetativo (Avonce *et al.*, 2004).

La primera evidencia de que el metabolismo de la trehalosa estaba involucrado en otras funciones además de osmoprotección surgió de la mutante de levadura *tps1*, la cual es incapaz de crecer en glucosa pero si puede crecer en un azúcar no-fermentable como la galactosa. Esto sugiere que TPS tiene un rol regulatorio en la glucolisis, donde glucosa-6-fosfato es convertida en trehalosa como mecanismo de restricción del flujo glucolítico (Thevelein, 1996). En la levadura la mutante doble *tps1hvk2Δ* carece de ambas TPS y hexocinasa 2 (HXK2), y puede crecer en presencia de glucosa. La función principal de HXK2 es agregar residuos de fosfatos a la glucosa como una vía hacia la glucolisis. Se ha demostrado que la T6P inhibe la actividad de HXK2 de levadura, por lo que se cree que este metabolito regula la glucolisis modulando la fosforilación de los azúcares hacia esta vía (Thevelein, 1996; Blázquez *et al.*, 1998).

Una variedad de señales incluyendo las de glucosa, sacarosa, nitrato, ácido abscísico, citocinina y el desarrollo regulan TPS y TPP a nivel genético. TPSs también están reguladas post-traduccionalmente por la fosforilación de proteínas por SnRK1 e interactúa con las proteínas 14-3-3. Estos mecanismos proporcionan un medio para la regulación de los niveles de T6P en diferentes tejidos y en diferentes condiciones. T6P regula el metabolismo de carbohidratos y respuestas a estrés que influyen en rasgos importantes tales como la fotosíntesis, el desarrollo, la pared celular y la deposición de almidón, y tolerancia a la sequía (Figura 4) (Paul, 2007).

La T6P es considerada una molécula de señalización para la disponibilidad de carbono: cuando la disponibilidad de carbono se incrementa por disponibilidad de sacarosa el contenido de T6P se eleva (Schluepmann *et al.*, 2004; Lunn *et al.*, 2006). Recientemente se ha identificado la señalización de T6P en tejido joven. En semillas, hojas jóvenes y otros tejidos meristemáticos como la coliflor donde T6P inhibe la actividad catalítica de

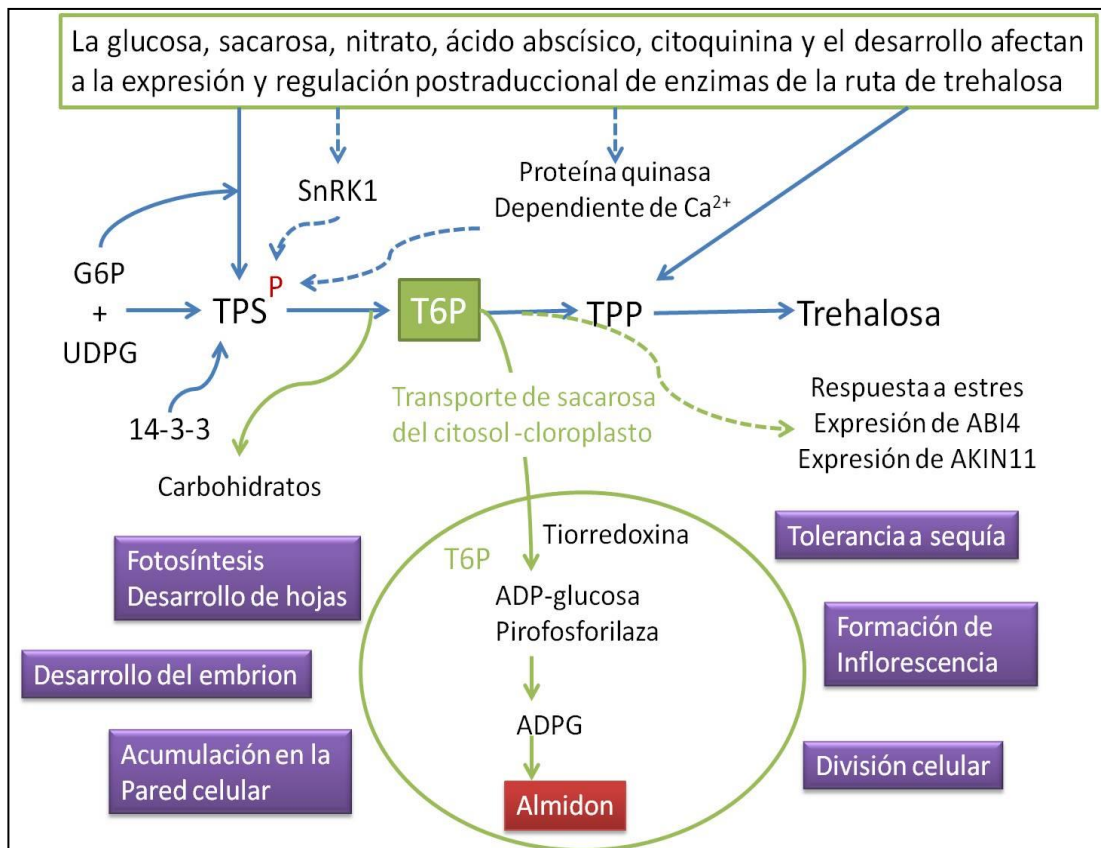


Figura 4. Contexto funcional de T6P en plantas.

SnRK1 (Zhang *et al.*, 2009; Paul *et al.*, 2010). SnRK1 es una proteína cinasa regulatoria, central en la respuesta a exceso/falta de nutrientes, en el crecimiento, y en la respuesta a estrés en relación a la energía y aporte de carbono (Baena-González *et al.*, 2007).

Los cambios en la expresión genética en semillas de *Arabidopsis* con un incremento o decremento de T6P son consistentes con la inhibición de SnRK1 por T6P *in vivo* (Zhang *et al.*, 2009). Esta regulación también concuerda con el rol de T6P en la señalización cuando el suplemento de carbono es alto. Sin embargo una proteína intermediaria adicional, que no se encuentra o es inestable en extractos de hojas maduras, es requerida para la inhibición de SnRK1 por T6P (Nunes *et al.*, 2013). La interacción de T6P con SnRK1 fue confirmada en semillas de *Arabidopsis* sobre expresando el gen KIN10 de SnRK1, las cuales no crecieron a altas concentraciones de trehalosa, lo que resulto en acumulación de T6P (Delatte *et al.*, 2011).

En años recientes se ha sugerido que la inhibición de SnRK1 juega un rol en el desarrollo del grano de trigo (Martínez-Barajas *et al.*, 2011) y en el crecimiento de papa (Debast *et al.*, 2011). Basado en el rol central de T6P no es sorpresa que alteraciones en su metabolismo resulten en diversos efectos en el desarrollo (Eastmond *et al.*, 2002). Sin embargo la mutante puede ser complementada por la expresión del gen TPS de bacteria *otsA* (Schluepmann *et al.*, 2003), o por la expresión del gen TPS1 por un promotor específico de semillas (Gómez *et al.*, 2010). Además, la respuesta a la alteración del azúcar en las semillas de *Arabidopsis* con un incremento o decremento de T6P a través de la expresión de *otsA* o del gen TPP, *otsB* respectivamente, demostraron que T6P es requerido en la utilización del carbono y crecimiento (Schelupmann *et al.*, 2003).

Se ha demostrado que el gen TPS1 de *Arabidopsis* es requerido para el desarrollo vegetativo y en la transición floral (Van Dijken *et al.*, 2004; Gómez *et*

*al.*, 2010). En tabaco un incremento en T6P aumentó la capacidad fotosintética en las hojas, y a su vez un decremento en el área de la hoja. Por el contrario bajos niveles de T6P mostraron un decremento en la fotosíntesis (Pellny *et al.*, 2004). Lo que sugiere un papel importante de T6P en el desarrollo de la fotosíntesis y expansión de las hojas.

La detección de trehalosa y T6P en plantas es un problema potencial, ya que ambos se encuentran en niveles tan bajos, que puede dar lugar a mediciones inexactas. Lunn y colaboradores (2006) desarrollaron un ensayo muy sensible para medir T6P en el rango de “femto-picomolas” en plantas de *Arabidopsis* deficientes de sacarosa. Después de adicionar sacarosa se encontró que los niveles de T6P se incrementaron al igual que la concentración de azúcar. Adicionalmente se encontró que los aumentos en los niveles de sacarosa y T6P, condujeron a un cambio en el estado redox de ADP-glucopirofosforilasa y en la estimación de síntesis de almidón in vivo (Lunn *et al.*, 2006).

### Estrés Abiótico en Plantas

El crecimiento de las plantas y su productividad son afectados por diversos factores ambientales, tales como, luz, agua, salinidad del suelo y temperatura, dichos factores pueden provocar estrés abiótico cuando las condiciones se encuentran fuera de los rangos óptimos (Yancey *et al.*, 1982). El estrés abiótico más común es el déficit de agua, causado por deshidratación, salinidad o congelamiento, el cual afecta adversamente el crecimiento y desarrollo de la planta alterando su metabolismo y expresión genética (Ingram y Bartels, 1996; Bray, 1997). Durante periodos de sequía, la planta atraviesa diversos cambios fisiológicos e induce un gran número de genes para su adaptación (Ingram y Bartels, 1996).

El déficit de agua también puede ser provocado por alta salinidad, frío o altas temperaturas. En respuesta a estos tipos de estrés las plantas utilizan diversas estrategias de defensa para enfrentar estas condiciones desfavorables. Un cambio típico en la expresión durante un periodo de déficit de agua es la inducción de genes implicados en la síntesis de diferentes osmolitos, como por ejemplo glicina betaína, prolina, y trehalosa, así como proteínas de bajo peso molecular, tales como proteínas LEA por sus siglas en inglés (Late embryogenesis abundant) (Ingram y Bartels, 1996; Ramanjulu y Bartels, 2002). La sobreproducción de estas moléculas en plantas transgénicas ha demostrado sus efectos protectores contra el estrés por sequía, alta salinidad y frío (Holmström *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 1997; Garg *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2003).

El cambio climático y el suministro limitado de agua en varias regiones en todo el mundo destacan la necesidad de diseñar estrategias para mejorar la tolerancia al estrés en plantas de cultivo. La ingeniería genética de la tolerancia al estrés se ha convertido en uno de los principales objetivos de la investigación agrícola. A nivel molecular, las plantas se adaptan a las presiones abióticas mediante la expresión de diferentes genes.

### Cambios Fisiológicos y Morfológicos bajo Condiciones de Estrés

El funcionamiento de las plantas puede afectarse durante la exposición a condiciones de estrés. En el caso de plantas de trigo tolerantes y no tolerantes a la desecación puede ocurrir una supresión progresiva de la asimilación del carbono fotosintético (Deltoro *et al.*, 1998). Esto es atribuido tanto a un control estomático como no estomático (Shangguan *et al.*, 1999). En algunos estudios se ha observado que aumentos en la temperatura de 2-4°C provocan una reducción en el rendimiento de muchos cultivos dependiendo de la especie y el cultivar (Hassan, 2006). Esto puede llevar a que el período de producción de grano sea afectado por las altas temperaturas, lo cual a su vez afecta

negativamente las fases sensibles del desarrollo de floración. En consecuencia, se obtiene una reducción en la producción del grano y en el rendimiento del cultivo (Hassan, 2006).

## Estrés Hídrico

Actualmente se sabe que el estrés hídrico puede afectar diversos aspectos de la fisiología de las plantas, incluyendo su crecimiento (McDonald y Davies, 1996), vías de señalización (Chaves *et al.*, 2003), expresión genética (Bray, 2002), y fotosíntesis (Lawlor y Cornic, 2002; Flexas *et al.*, 2004). Por esto se le considera un factor limitante que podría condicionar el rendimiento de los cultivos en todo el mundo, también puede alterar la respuesta al aumento de temperatura. Havaux (1992) demostró que la sobre exposición a altas temperaturas provoca un aumento en la actividad del fotosistema II (PSII) en hojas de papa de plantas con estrés hídrico. Esto se ve reflejado por un ligero aumento en la variable de fluorescencia-máxima de clorofila. Además, se sabe que el PSII tiene un papel importante en la respuesta de las plantas al estrés ambiental, ya que es un componente muy sensible de los sistemas fotosintéticos (Yordanov *et al.*, 2000; Chaves *et al.*, 2009).

La mayoría de los escenarios de cambio climático predicen un aumento de la incidencia de la sequía a lo largo de diferentes regiones del mundo (Susan, 2007). Se predice una mayor demanda de agua debido a que las actividades agrícolas requieren el uso intensivo de agua, aunado al aumento de las tierras de cultivo árido y semiárido junto con el aumento de la población y la explotación de las tierras de cultivo. Lo que puede afectar directamente el crecimiento de los cultivos, su supervivencia y rendimiento (Chaves *et al.*, 2009).

La limitación del crecimiento de las plantas debido a la baja disponibilidad de agua se debe principalmente a la reducción del balance planta-carbono que depende en gran medida de la fotosíntesis (Flexas *et al.*, 2009). Sin embargo, hay un debate en curso acerca de si el factor restrictivo para la fotosíntesis durante el estrés hídrico es el cierre de los estomas y la resistencia difusiva o el desacoplamiento metabólico (Flexas y Medrano, 2002; Lawlor y Cornic, 2002; Flexas *et al.*, 2009; Pinheiro y Chaves, 2011).

Un decremento en la difusión de CO<sub>2</sub> atmosférico al sitio de carboxilación de las hojas generalmente es considerado la causa principal del decremento de la fotosíntesis durante condiciones de estrés hídrico (Flexas *et al.*, 2004; Grassi y Magnani, 2005; Chaves *et al.*, 2009). Por otra parte, cuando existe un decremento en la conductancia estomática y es combinado con irradiación sostenida, las hojas están sujetas a un exceso de energía incidente relativo a la disponibilidad de CO<sub>2</sub> intercelular debido a que la reducción de la tasa de producción de energía es superior a su tasa de consumo durante el ciclo de Calvin (Pinheiro y Chaves, 2011). Bajo estas circunstancias, la baja regulación e incluso la fotoinhibición de la fotosíntesis pueden convertirse en un potente mecanismo de defensa de las plantas C<sub>3</sub>. Esta protección puede ser alcanzada por disipación termo-regulada que ocurre en los complejos recolectores de luz e involucra a las xantofilas (Demmig-Adams y Adams, 2006) y el ciclo de la luteína (García-Plazaola *et al.*, 2003).

Los mecanismos de fotoprotección compiten con fotoquímicos por la energía absorbida causando baja regulación de la fotosíntesis, revelado por el decremento del rendimiento cuántico del fotosistema II (PSII) (Genty *et al.*, 1989). Sin embargo algunos reportes con respecto a los efectos del estrés hídrico en la funcionalidad del PSII son contradictorios y el sitio exacto y los mecanismos de daño del PSII no han sido elucidados (Georgieva *et al.*, 2005; Sperdoui y Moustakas, 2012). Muchos estudios *in vivo* han demostrado que el estrés hídrico daña el núcleo del complejo de oxígeno en evolución y los centros de reacción (Skotnica *et al.*, 2000; Colom y Vazzana, 2003). Mientras que en otros estudios han demostrado que el PSII no es afectado o que solamente es afectado bajo condiciones de estrés hídrico severas (Massacci *et al.*, 2008; Flexas *et al.*, 2009).

Además del metabolismo de respuesta de las plantas, el balance del carbono durante el estrés hídrico y su recuperación dependen de la velocidad y el desarrollo de la recuperación fotosintética porque éste último depende del grado y la velocidad de decremento en la fotosíntesis durante el déficit de agua



(Flexas *et al.*, 2006). En general, las plantas sujetas a un severo estrés hídrico exhibieron 40-60% de su máxima tasa de fotosíntesis 1 día después de riego y esta recuperación continuó durante los días siguientes. Sin embargo, la tasa de fotosíntesis no siempre es restaurada (Sofo *et al.*, 2004; Flexas *et al.*, 2009).

La influencia de la severidad del estrés hídrico en la velocidad y el grado de recuperación ha sido demostrada en *Phaseolus vulgaris* (Miyashita *et al.*, 2005) y en *Vitis* Hybrid Richter -110 (Flexas *et al.*, 2009). Sin embargo la recuperación fotosintética no solamente depende de la severidad del estrés y de la especie estudiada, además de las complejas interacciones con la planta, edad de la hoja, intensidad de luz y los ciclos de déficit de agua, entre otros (Flexas *et al.*, 2004).

### Estrés Salino

El exceso de sal en el suelo afecta adversamente el desarrollo y crecimiento de las plantas, alrededor del 20% del área cultivada en el mundo y aproximadamente la mitad de los suelos irrigados en el mundo son afectados por la salinidad (Zhu *et al.*, 2001). Los procesos de germinación, crecimiento de la plántula, vigor y desarrollo vegetativo, floración y producción de frutos son adversamente afectados por altas concentraciones de sal, en última instancia causan pérdidas económicas y una disminución de la calidad de la producción (Parida y Das, 2005).

La sequía y salinidad pueden afectar la relación “mineral-nutriente” en plantas. Generalmente se reduce la absorción de nutrientes por las raíces y el transporte de nutrientes de las raíces a los brotes, debido a la restricción en las tasas de transpiración y deterioro en el transporte activo y permeabilidad de la membrana (Hu y Schmidhalter, 2005). El descenso en la humedad del suelo también provoca un decremento en la difusión de la tasa de nutrientes en la superficie de absorción de las raíces (Pinkerton y Simpson, 1986). En contraste los suelos con concentraciones extremas de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+} : \text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$  :

$\text{NO}_3^-$  bajo condiciones salinas causan reducción en el crecimiento de las plantas debido a toxicidad iónica y desbalances iónicos actuando en componentes biofísicos y metabólicos del crecimiento de las plantas (Grieve *et al.*, 2004).

El estrés salino afecta a las plantas limitando su crecimiento y productividad (Parida y Das, 2005). El estrés salino es un problema creciente, además resalta la importancia de identificar estrategias para incrementar la tolerancia a la salinidad de las plantas a través de la ingeniería genética. El estrés salino causa daño molecular en las células de las plantas lo que ocasiona estrés hiperosmótico, trastornos y toxicidad iónica. En los casos de estrés salino leve, este primeramente limita el crecimiento y el desarrollo de la planta así como su productividad, pero en casos extremos el estrés salino puede conducir a la muerte de las plantas (Aoki *et al.*, 2005).

El efecto del estrés salino depende de la especie de planta. Durante el comienzo y desarrollo del estrés salino la mayoría de los procesos se alteran, incluyendo la fotosíntesis, síntesis de proteínas, producción de energía y el metabolismo de lípidos (Parida y Das, 2005). El estrés salino causa déficit de agua en las plantas lo que ocasiona estrés oxidativo. El déficit de agua causa una reducción de la tasa de fotosíntesis y exposición de los cloroplastos a un exceso de energía de excitación lo que limita la fijación del dióxido de carbono conduciendo a la generación de especies reactivas de oxígeno. El estrés oxidativo acelera la producción de especies reactivas de oxígeno y en consecuencia altera el balance entre la formación y remoción de estas especies (Triantaphylidès y Havaux, 2009).

### Transformación de Plantas con Genes para Síntesis de Trehalosa

Una estrategia que se ha utilizado para obtener plantas tolerantes o resistentes a estrés hídrico causado tanto por salinidad como sequía ha sido transformar plantas con diversos genes involucrados en la síntesis de osmolitos y

osmoprotectores (Wang *et al.*, 2003; Bhatnagar-Mathur *et al.*, 2008; Ashraf, 2010). Los primeros intentos por obtener plantas transformadas capaces de acumular trehalosa se realizaron con tabaco empleando el gen *otsA* de *E. coli* o el gen *ScTPS1* de levadura. Las plantas resultantes presentaron tolerancia a la sequía (Holmström *et al.*, 1996; Pilon-Smits *et al.*, 1998), sin embargo, estas plantas presentaron efectos pleiotrópicos. En otras investigaciones se transformaron plantas de tomate y papa expresando el gen *TPS1* las cuales mostraron tolerancia a la sequía (Yeo *et al.*, 2000; Cortina y Culiáñez-Macià, 2005), como en el caso de tabaco estas plantas presentaron alteraciones morfológicas y anomalías de crecimiento (Cuadro 1).

En diferentes trabajos se ha estudiado la expresión constitutiva de los genes *TPS* y *TPP* de *E. coli* o levadura en plantas de tabaco o papa. En la mayoría de los casos esto ha dado como resultado efectos pleiotrópicos. Algunos de estos efectos incluyen retraso en el crecimiento y alteración en el sistema de raíces bajo condiciones de crecimiento normales (Holmström *et al.*, 1996; Goddijn *et al.*, 1997; Romero *et al.*, 1997; Pilon-Smits *et al.*, 1998).

Garg y colaboradores (2002) realizaron la sobreexpresión regulada de los genes de síntesis de trehalosa de *E. coli* (*otsA* y *otsB*) en una fusión para manipular la tolerancia al estrés abiótico en arroz. Esta fusión tiene la ventaja de necesitar un solo evento de transformación. La expresión del transgen se llevó a cabo bajo control tejido-específico y promotores dependientes de estrés. Comparado con arroz no transgénico, la mayoría de las líneas transgénicas mostraron crecimiento normal, menos daño foto-oxidativo y un mejor balance de minerales bajo estrés hídrico y bajas temperaturas. Dependiendo de las condiciones de crecimiento, las plantas de arroz transgénico acumularon de 3-10 veces más trehalosa respecto a los controles no transgénicos (Garg *et al.*, 2002).

En un estudio similar la expresión de la fusión del gen que codifica para trehalosa fosfato sintasa y la región carboxilo terminal de trehalosa fosfato fosfatasa al ser expresada en *Arabidopsis*, produjo plantas sin alteraciones

morfológicas, además de ser tolerantes a sequía, salinidad congelamiento y calor (Miranda *et al.*, 2007).

En alfalfa la expresión de esta enzima bifuncional TPS-TPP mostró un incremento en la tolerancia a múltiples estreses abióticos, sin embargo cuando el promotor constitutivo 35S fue utilizado las plantas presentaron menor altura (Suárez *et al.*, 2009). En cambio, al utilizarse el promotor inducible por estrés RD29A las plantas de alfalfa fueron más altas con un significativo aumento en la biomasa. El bajo contenido de trehalosa acumulada en las plantas transformadas no fue suficiente para explicar su papel como osmoprotector, sin embargo alteraciones en la expresión de genes de señalización y de respuesta a estrés podrían explicar este fenotipo (Cuadro 1) (Suárez *et al.*, 2009).

En un estudio de Lyu y colaboradores (2013) se generaron plantas transgénicas de tomate mediante la introducción de un gen codificante para la fusión bifuncional de trehalose-6-fosfato sintasa y trehalose-6-fosfato fosfatasa de *E coli* bajo el control del promotor CaMV35S. Estas plantas junto con plantas de tipo silvestre fueron sometidas a tratamiento de estrés salino. Las plantas transgénicas acumularon altas cantidades de trehalosa en sus hojas y mostraron un incremento en la tolerancia a salinidad y sequía y un incremento en la fotosíntesis en comparación de las plantas silvestres bajo condiciones de estrés salino. En este estudio todas las plantas transgénicas mostraron apariencia normal y patrones normales de crecimiento (Cuadro 1).

Dado que se ha visto que la construcción usada para transformar plantas que sobre expresen la o las enzimas de síntesis de trehalosa y a que la sobre expresión depende del tipo de planta, así como del tipo de estrés aplicado, el objetivo de éste trabajo fue determinar el efecto en la fisiología y morfología de plantas de trigo que sobre expresan una enzima capaz de llevar a cabo la condensación de UDP-glucosa y glucosa 6-fosfato para formar trehalosa sin la formación del intermediario T6P bajo condiciones de estrés salino.

Cuadro 1. Transformaciones de plantas con genes de síntesis de trehalosa

Planta	Gen	Organismo de origen	Alteraciones Morfológicas	Tolerancia	Referencia
Tabaco	TPS1	Levadura	Si	Sequía	(Holmström <i>et al.</i> , 1996)
Tabaco	<i>OtsA</i>	<i>E. coli</i>	Si	Sequía	(Pilon-Smits <i>et al.</i> , 1998; Garg <i>et al.</i> , 2002)
Papa	TPS1	Levadura	Si	Sequía	(Yeo <i>et al.</i> , 2000)
Arroz	<i>OtsA-OtsB</i>	<i>E. coli</i>	No	Sequía, salinidad, frío	(Garg <i>et al.</i> , 2002)
Tomate	TPS1	Levadura	Si	Sequía, salinidad	(Cortina y Culiáñez-Macià, 2005)
Arabidopsis	TPS1	<i>Arabidopsis</i>	Retraso en floración	Sequía	(Avonce <i>et al.</i> , 2006)
Arabidopsis	TPS1-TPS2	Levadura	No	Sequía, salinidad, calor, congelamiento	(Miranda <i>et al.</i> , 2007)
Alfalfa	TPS1-TPS2	Levadura	Si	Sequía, salinidad, calor, congelamiento	(Suárez <i>et al.</i> , 2009)
Tomate	TPS1-TPS2	<i>E. coli</i>	No	Sequía, salinidad	(Lyu <i>et al.</i> , 2013)

## **HIPOTESIS**

La transformación con el gen *ScTPS1-TPS2* que codifica para síntesis de trehalosa provoca cambios fisiológicos pero no morfológicos en plantas de trigo sometidas a estrés salino.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar cambios fisiológicos y fenotípicos de plantas de trigo transformadas con el gen *ScTPS1-TPS2* que codifica para la síntesis de trehalosa sometidas a estrés salino.

### Objetivos Particulares

- Cultivar plantas de trigo transformadas y no transformadas con el gen para síntesis de trehalosa *ScTPS1-TPS2*.
- Someter plantas transformadas y no transformadas a estrés salino.
- Determinar los cambios en la biomasa de las plantas transformadas y no transformadas sometidas a estrés salino.
- Identificar cambios morfológicos en plantas transformadas y no transformadas.
- Evaluar cambios en la fisiología de plantas transformadas y no transformadas.

## MATERIALES Y METODOS

### Material Biológico

Se utilizaron semillas de trigo (*Triticum aestivum*) de la variedad Kronstad F2004 generación T3 transformadas previamente por Valenzuela-Avendaño (2012) con una fusión bifuncional del gen para síntesis de trehalosa TPS-TPP de *saccharomyces cerevisiae* bajo el control de dos promotores, uno de ellos dirigido bajo el promotor rd29A el cual es inducido bajo estrés y el segundo promotor 35S el cual es constitutivo y el gen de selección que confiere resistencia al herbicida fosfinotricina (PPT).

### Esterilización de Material Biológico

Para su esterilización las semillas T3 fueron sumergidas en Tween 20 al 0.05% por 30 minutos en agitación suave y constante, posteriormente pasaron por 3 lavados con H<sub>2</sub>O destilada estéril por 30 minutos en agitación suave y constante, seguido por una desinfección con PPM (Preservative Plant Mixture) al 10% en agitación suave y constante durante 20 minutos, por ultimo fueron lavadas 3 veces con H<sub>2</sub>O destilada estéril por 40 minutos.



## Tiempo de Germinación y Viabilidad de la Semilla

Posterior a la esterilización las semillas se colocaron en placas Petri con papel filtro, se hidrataron con agua destilada estéril y se cubrieron con papel parafilm para evitar la pérdida de humedad a 25 °C y oscuridad (Figura 5). Se hicieron observaciones diarias para establecer el tiempo de germinación, para esto se tomó en cuenta el primer brote que emergió de la semilla. Se comparó el tiempo de germinación de las semillas transformadas y no transformadas. La viabilidad de las semillas se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

Viabilidad = (semillas germinadas/ semillas totales) X 100.

## Obtención de Plantas Maduras

Después de la germinación, el material biológico fue sometido a selección, el material biológico se colocó en tubos de 50 mL con medio MSS (Murashige & Skoog y sacarosa), herbicida fosfinotricina (PPT) (Cuadro 2) y con 100 mM de NaCl por un periodo de 6 semanas, con fotoperiodo de 16h/8h luz/oscuridad a una temperatura de 25±2°C las plántulas sobrevivientes se consideraron como transformadas. Las plántulas transformadas fueron colocadas en vasos de unicel con termolita y llevadas a un cuarto de crecimiento, con fotoperiodo de 16h/8h luz/oscuridad a una temperatura de 25±2°C, se regaron diariamente con solución de Hoagland (Cuadro 3). Se evaluó el tiempo de espigamiento y de antesis de las plantas.

## Tratamiento de Estrés Salino

El tratamiento de estrés salino se realizó con 3 líneas de plantas de trigo transformadas (RD29A) y con plantas no transformadas de 10 semanas de

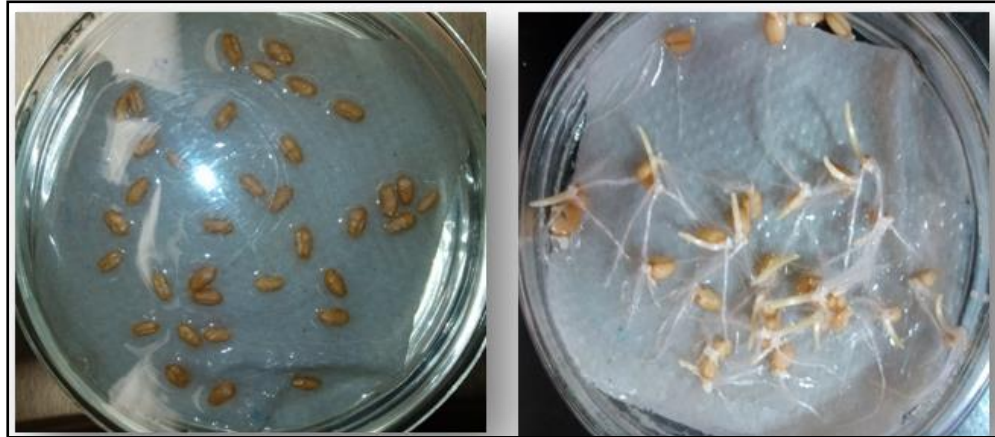


Figura 5. Germinación de semillas RD29A (3 días de imbibición).

Cuadro 2. Composición de medio MSS empleado como medio de selección para plántulas.

	<b>Conc/lt</b>	<b>1000mL</b>
MS	3g	3g
Sacarosa	20g	20g
PPM	0.05%	500µl
PPT	3mg	3ml
Agar	8g	8g
pH 5.8		

\*MS (Murashige & Skoog)

Cuadro 3. Micronutrientes y macronutrientes empleados en la solución de Hoagland utilizada para el riego de las plantas de trigo en termolita.

Micronutrientes			Macronutrientes		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	2.869g/L	1 ml/L	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	23.61g /100 ml	5 ml/L
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1.81g/L	1 ml/L	KNO <sub>3</sub>	10.11g /100 ml	5 ml/L
ZnCl <sub>2</sub>	.11g/L	1 ml/L	MgSO <sub>4</sub>	24.65g /100 ml	2 ml/L
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.05g/L	1 ml/L	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13.609g /100 ml	1 ml/L
NaMoO <sub>4</sub>	0.025g/L	1 ml/L	(Fe.EDTA)		
			FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	2.42g /250 ml	1 ml/L
			EDTA	2.62g/ 250 ml	

edad. Las plantas fueron regadas diariamente con solución de Hoagland (Cuadro 3) bajo las concentraciones de 0, 200 y 400 mM de NaCl durante 5 días. Posterior al tratamiento de salinidad las plantas se volvieron a regar diariamente con solución de Hoagland y se dejaron madurar hasta producir semillas. Durante el tratamiento de estrés salino se evaluaron parámetros de intercambio de gases y fluorescencia de la clorofila de las plantas transformadas y no transformadas, estas evaluaciones se realizaron en los días 0, 1, 3, 5 y a los 7 días de la recuperación del tratamiento de estrés salino.

### Fotosíntesis y Estado del Fotosistema II

Los parámetros de intercambio de gases se obtuvieron con un equipo LI-COR LI-6400XT Portable Photosynthesis System, así como el rango de asimilación de CO<sub>2</sub> (A), rango de transpiración (E), conductancia estomática (G<sub>s</sub>), concentración subestomatal de CO<sub>2</sub> (C<sub>i</sub>). La fluorescencia fue medida con un equipo Handy PEA chlorophyll fluorescence system (Hansatech Instruments Inc, Norfolk UK), las mediciones se hicieron de acuerdo al método de saturación (Schreiber *et al.* 1995). Después de un periodo de 30 minutos de oscuridad con un clip en la segunda hoja de la planta. Los parámetros fueron determinados por el máximo rendimiento cuántico del fotosistema II (F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>), por el flujo de energía absorbida por sección transversal, reducción de la capacidad de QA, flujo de energía de transporte de electrones por sección transversal (E<sub>T</sub>o/C<sub>s</sub>), flujo de energía atrapada en el fotosistema II por sección transversal (T<sub>R</sub>o/C<sub>s</sub>) y energía de disipación en el fotosistema II por sección transversal (D<sub>I</sub>o/C<sub>S</sub>).

## Evaluación de la Biomasa Seca

La evaluación de la biomasa seca fue realizada con plantas transformadas y no transformadas sometidas al tratamiento de estrés salino bajo las concentraciones 0, 200 y 400 mM de NaCl, se realizó al final del ciclo de vida de las plantas. Las plantas se extrajeron de las macetas con termolita y se evaluaron las partes aéreas y terrestres de las plantas; tamaño de la planta, tamaño del tallo de la planta, tamaño y peso de espiga, número de espigas, cantidad de semillas, tamaño y peso de raíz, así como peso de la biomasa total de la planta.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Germinación y viabilidad de la semilla

La germinación de las semillas transformadas con el promotor inducible bajo estrés RD29A fue de dos a tres días, las cuales presentaron el mismo tiempo de germinación que las semillas no transformadas, al igual que las semillas 35S (Cuadro 4). En un estudio de Jang y colaboradores (2003) con plantas de arroz transformadas con una fusión de TPS y TPP de *E. coli*, se encontró un retraso de tres días en la germinación. Sin embargo las plantas de trigo transformadas con el gen *ScTPS1-TPS2* ya sea con el promotor RD29A o 35S no presentaron retraso en germinación, esto coincide con lo reportado por Suarez y colaboradores (2009) en alfalfa y con Miranda y colaboradores (2007) en *Arabidopsis* transformadas con el mismo gen y construcciones utilizadas en éste trabajo.

Una vez germinadas las semillas, las plántulas fueron sometidas a selección con el herbicida PPT. A las 2 semanas de crecimiento en tubos con PPT y NaCl, se observó que las plántulas con la concentración 100 y 200 mM de NaCl desarrollaron tallos más gruesos y raíces más largas y gruesas en comparación con las plántulas con 50 mM de NaCl (Figura 6). Lo cual sugiere que las plantas transformadas son tolerantes a salinidad y que nos permitió definir las concentraciones de NaCl a probar en las plantas adultas. Esto indica que una concentración de NaCl moderada puede ayudar a que las plantas transformadas desarrollen tallos y raíces más gruesas.

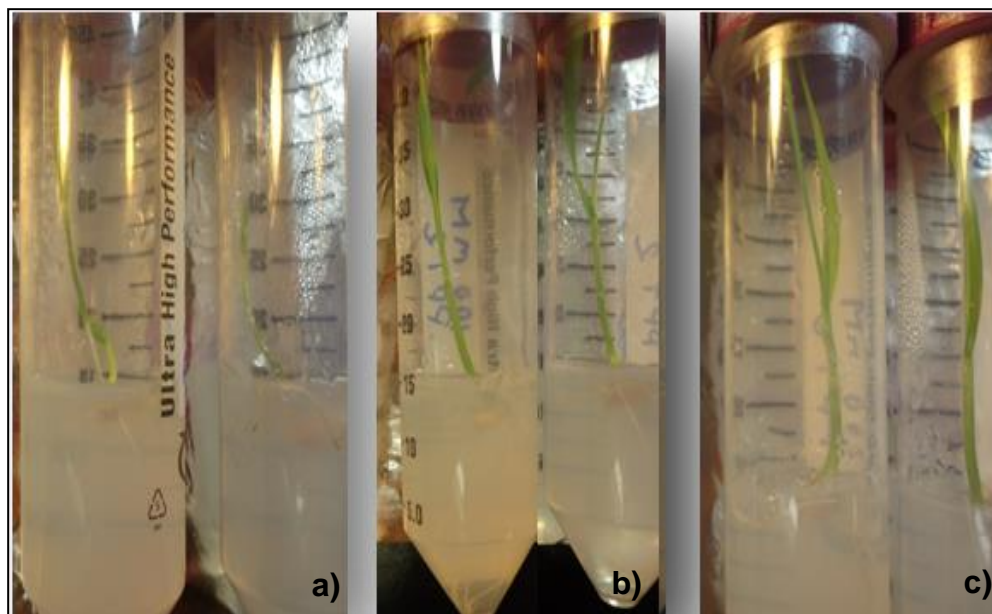


Figura 6. Plántulas RD29A en selección con PPT y NaCl. El medio de cultivo contenía 3 mM de PPT(a) 50 mM de NaCl, (b) 100 mM de NaCl y (c) 200 mM de NaCl, a las 2 semanas.



Las plántulas RD29A presentaron un mayor porcentaje de sobrevivencia a PPT (Cuadro 4) en comparación con las plántulas 35S por lo que ya no se continuó trabajando con ellas. Este resultado es interesante ya que al parecer la expresión constitutiva del transgen está teniendo un impacto importante en la sobrevivencia de las plántulas de trigo. En plantas de *Arabidopsis* y alfalfa transformadas con la misma construcción que las plantas de trigo, no se encontró un efecto similar al nuestro por lo que es importante continuar analizando la inserción del transgen, el número de copias y la concentración de trehalosa (Miranda et al., 2007; Suarez et al. 2009).

## Fotosíntesis y estado del fotosistema II

En la Figura 7 se puede observar en el día 0 del tratamiento de salinidad que no hay diferencias significativas en la variable de asimilación de CO<sub>2</sub> entre los tratamientos tanto para las plantas transformadas como no transformadas, lo que indica que las plantas presentaban rangos de asimilación de CO<sub>2</sub> muy similares antes de iniciar el tratamiento de estrés salino. Al día 1 de tratamiento de estrés salino se observa una disminución en la asimilación de CO<sub>2</sub> en todas las plantas siendo más bajo para las plantas no transformadas con un 26% para el tratamiento de 200 mM y 46% para el tratamiento de 400 mM de NaCl con respecto al testigo. En general la línea 3C fue la que presentó la menor disminución en asimilación de CO<sub>2</sub> al primer día de estrés, 6% para el tratamiento de 200 mM de NaCl y de 16% para el tratamiento de 400 mM de NaCl con respecto al testigo.

En el día 3 de tratamiento de estrés salino la asimilación de CO<sub>2</sub> de las plantas transformadas empezó a decrecer de forma más notoria para las líneas 3A y 3B las cuales presentaron una reducción de más de 50% para el tratamiento de 400 mM de NaCl, mientras que la línea 3C disminuyó en un 32% para el tratamiento de 400 mM de NaCl con respecto al testigo.

Cuadro 4. Porcentaje y tiempo de germinación de semillas RD29A, 35S y no transformadas y porcentaje de sobrevivencia a PPT de plantas RD29A y 35S.

<b>Planta</b>	<b>% de germinación</b>	<b>Tiempo de germinación (Días)</b>	<b>% de Sobrevivencia a PPT</b>
RD29A-3 <sup>a</sup>	90	2	91
	98	3	
	100	4	
RB29A-3B	91	2	85
	95	3	
	100	4	
RD29A-3C	94	2	89
	100	3	
35S	89	2	25
	92	3	
	100	4	
NT	96	2	0
	100	3	

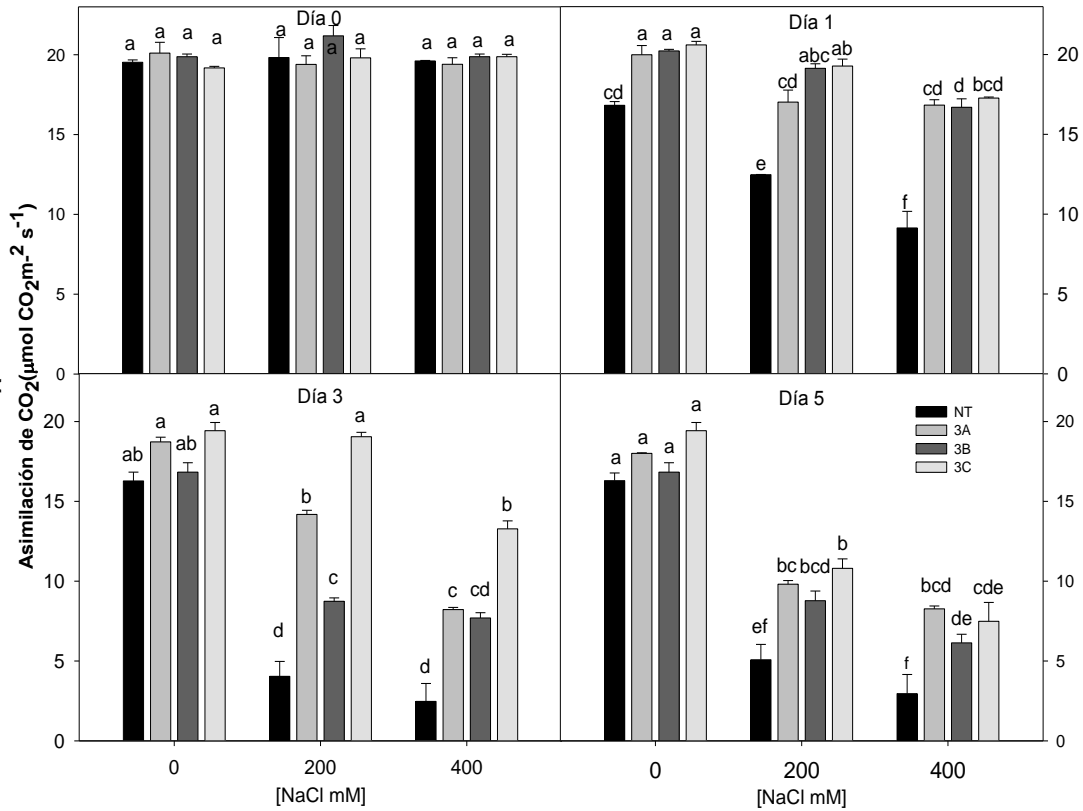


Figura 7. Efecto del estrés salino en la asimilación de CO<sub>2</sub> en plantas de trigo. (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C. \*Diferente literal en una misma columna indica diferencias significativas (P<0.05), media ± EE, n=4.

Por otro lado las plantas no transformadas disminuyeron un 75% su asimilación de CO<sub>2</sub> para el tratamiento de 200 mM y un 84% para el tratamiento de 400 mM de NaCl. Al día 5 de tratamiento las plantas presentaron el mismo patrón, para este día la línea 3C ya presenta disminución en la asimilación de CO<sub>2</sub> para ambas concentraciones de NaCl, para el tratamiento de 200 mM de NaCl presenta una disminución de 44% y 61% para 400 mM de NaCl con respecto al testigo.

En la Figura 8 se muestra el efecto en la asimilación de CO<sub>2</sub> a los 7 días de recuperación del tratamiento de estrés salino para las concentraciones de 0, 200 y 400 mM de NaCl en plantas transformadas y no transformadas. Todas las plantas presentaron una disminución en la asimilación de CO<sub>2</sub> en todos los tratamientos, lo que indica un daño en el aparato fotosintético de las plantas. La Figura 8 también muestra una disminución en los testigos para todas las líneas RD29A y NT lo que se puede atribuir a la edad de la planta, la línea 3C presenta los valores más bajos de asimilación de CO<sub>2</sub>, esto se puede atribuir al estado de madurez de la planta, esta misma línea fue la primera en espigar por lo tanto fue la primera en madurar; la asimilación de CO<sub>2</sub> está ligada a varios factores entre ellos; estado de madurez de la planta. La línea 3A mantuvo su asimilación de CO<sub>2</sub> en los tratamientos de 200 y 400 mM de NaCl, mientras que la línea 3B presentó disminución del 29% para el tratamiento de 200 mM y de 59% para 400 mM de NaCl.

Las plantas no transformadas presentaron una disminución del 80% al día 7 de recuperación para los tratamientos de 200 mM de NaCl y una pérdida total para el tratamiento de 400 mM de NaCl con respecto a su testigo, lo que indica que no hubo una recuperación después del tratamiento de NaCl para su aparato fotosintético en la concentración más alta de salinidad.

Lyu y colaboradores (2013) sometieron plantas de tomate a estrés salino (NaCl 150 mM) encontrando que al día 2 la asimilación de CO<sub>2</sub> disminuye 32% en plantas no transformadas y 18 % en una de sus 3 líneas transformadas mientras que las otras dos no sufren cambios significativos. Nuestros datos son

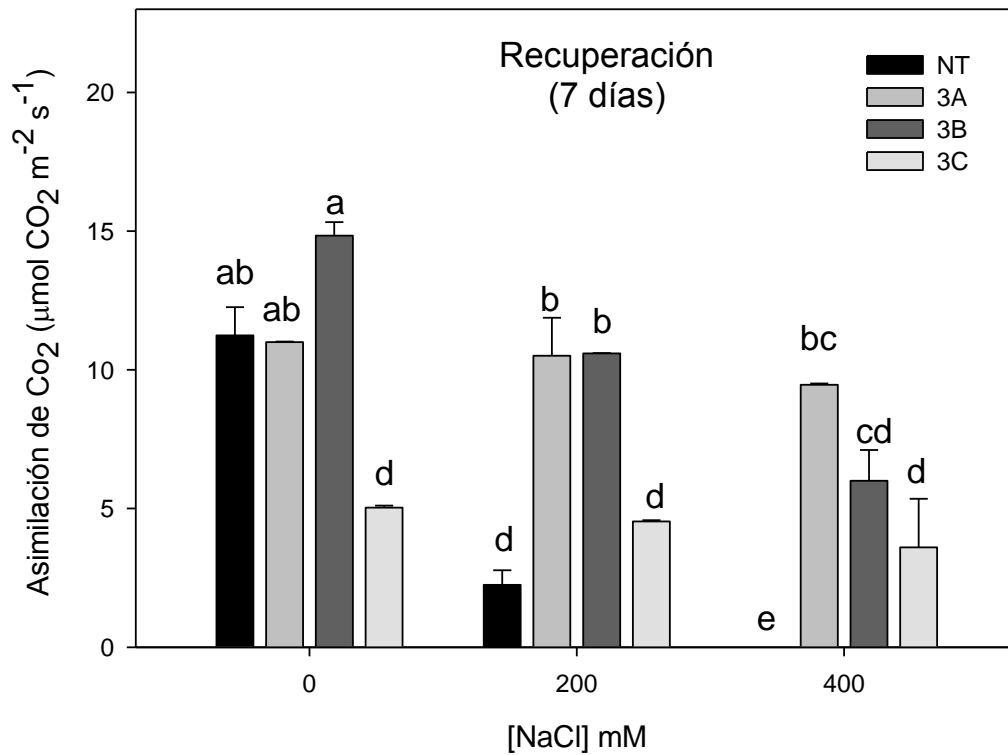


Figura 8. Asimilación de CO<sub>2</sub> de plantas sometidas a estrés salino después de 7 días de recuperación. Las plantas se regaron de manera constante después de terminado el tratamiento de estrés salino. (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C. \*Diferente literal en una misma columna indica diferencias significativas (P<0.05), media ± EE, n=4.

similares a los reportados por Lyu y colaboradores (2013) al principio del estrés salino, aun cuando la concentración de NaCl usada en éste estudio es mayor (200 y 400 mM). A diferencia de lo encontrado por Lyu y colaboradores (2013), las plantas de trigo toleraron los cinco días de estrés aplicado así como una concentración de NaCl mayor. Es claro que la expresión de la enzima bifuncional es la principal razón por la que las plantas de trigo muestran tolerancia al estrés salino, por lo que es de suma importancia determinar la concentración de trehalosa en dichas plantas, lo cual no se realizó durante este trabajo ya que eran parte de los objetivos de otro trabajo y aun no se han obtenido los resultados.

En la Figura 9 se muestra que no hay diferencias significativas para la variable conductancia estomática entre las líneas de las plantas RD29A y plantas no transformadas al día 0 del tratamiento de estrés salino. Para el día 1 del tratamiento de estrés salino se observa que las plantas no transformadas disminuyeron de manera significativa un 66% en la conductancia estomática para el tratamiento de 200 mM de NaCl y un 78% en el tratamiento de 400 mM de NaCl en comparación con el testigo. Las líneas de las plantas transformadas no presentaron una disminución significativa para la conductancia estomática en el día 1 del tratamiento de estrés salino para la concentración de 200 mM de NaCl, sin embargo, si fue significativa para la concentración de 400 mM de NaCl, la línea 3A presento una disminución de 31%, la línea 3B de 33%, mientras que la línea 3C presentó una reducción de 37% en comparación al testigo.

Al día 3 del tratamiento de estrés salino todas las plantas presentaron una disminución significativa en la conductancia estomática para las concentraciones de 200 mM y 400 mM en comparación a los testigos (Figura 9). La línea 3C presentó una disminución de 36% para el tratamiento de 200 mM de NaCl y de 38% para el tratamiento de 400 mM de NaCl, esta línea fue la que menos disminuyó en comparación a las otras líneas RD29A y plantas no

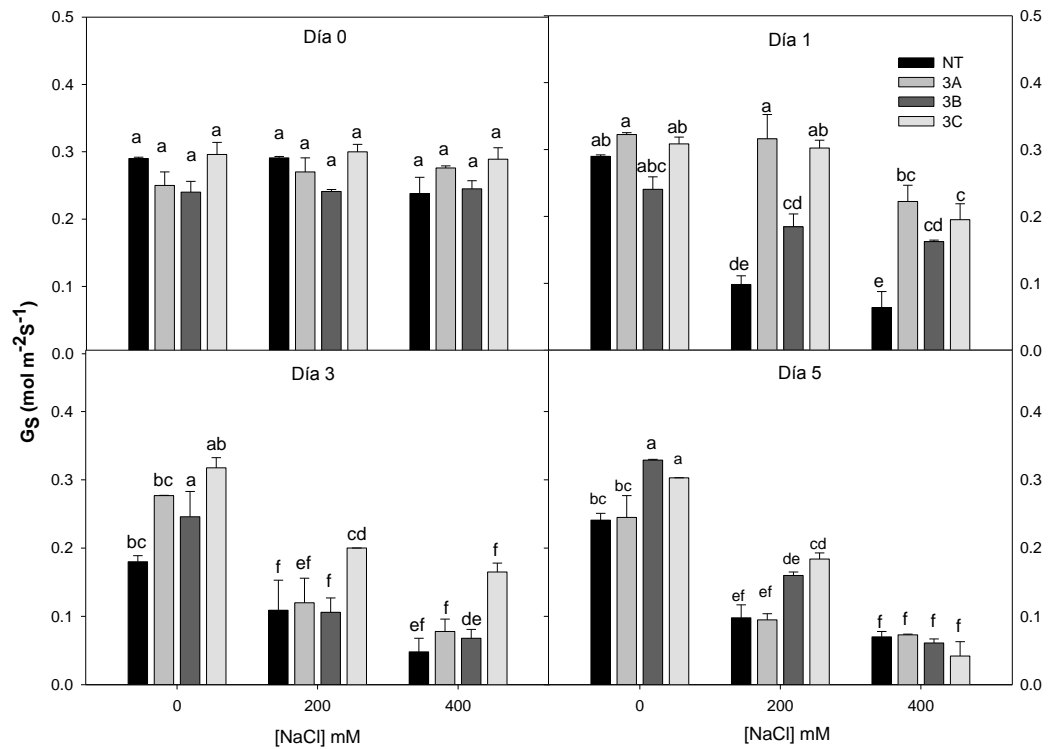


Figura 9. Efecto del estrés salino en la conductancia estomática ( $G_s$ ), (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C. \*Diferente literal en una misma columna indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), media  $\pm$  EE,  $n=4$ .

transformadas. Al día 5 del tratamiento las plantas continuaron con el patrón de disminución de la conductancia estomática siendo más drástico para la concentración de 400 mM de NaCl, no se encontraron diferencias significativas entre las líneas RD29A y las plantas no transformadas, todas las plantas presentaron una disminución de más de 70% en comparación a su testigo (Figura 9).

En la Figura 10 se muestra el efecto de los tratamientos de salinidad al día 7 de recuperación para plantas transformadas y no transformadas. Se observa una disminución en la conductancia estomática en los testigos, esto puede ser debido al estado de madurez de la planta. Al mismo tiempo se muestra una baja conductancia estomática en las plantas no transformadas para el tratamiento de 200 mM de NaCl y una conductancia casi nula para el tratamiento de 400 mM de NaCl. En las plantas transformadas se puede observar un ligero aumento en la conductancia estomática en comparación al día 5 de estrés salino en las líneas de las plantas transformadas. Aun cuando los valores de la conductancia estomática fueron bajos para las plantas transformadas se puede deducir que la transformación de estas plantas les permitió continuar con sus funciones vitales durante el tratamiento de estrés salino, sobre todo en la concentración menor de 200 mM de NaCl.

Los resultados de conductancia estomática muestran que las plantas RD29A sometidas a estrés salino son capaces de abrir sus estomas y captar CO<sub>2</sub>, durante las primeras horas del tratamiento de estrés, este comportamiento representa una ventaja para las plantas ya que les permite captar uno de sus nutrientes más importante. Sin embargo, la prolongación del estrés salino y el grado de salinidad obliga a las plantas a cerrar sus estomas para evitar una mayor pérdida de agua. Las plantas transformadas y sometidas a una concentración de NaCl de 200 mM mostraron una apertura estomática mayor que las plantas no transformadas cuando se les riega sólo con agua. Dicho resultado sugiere que la transformación con la enzima bifuncional representa una ventaja para las plantas sometidas a estrés salino.



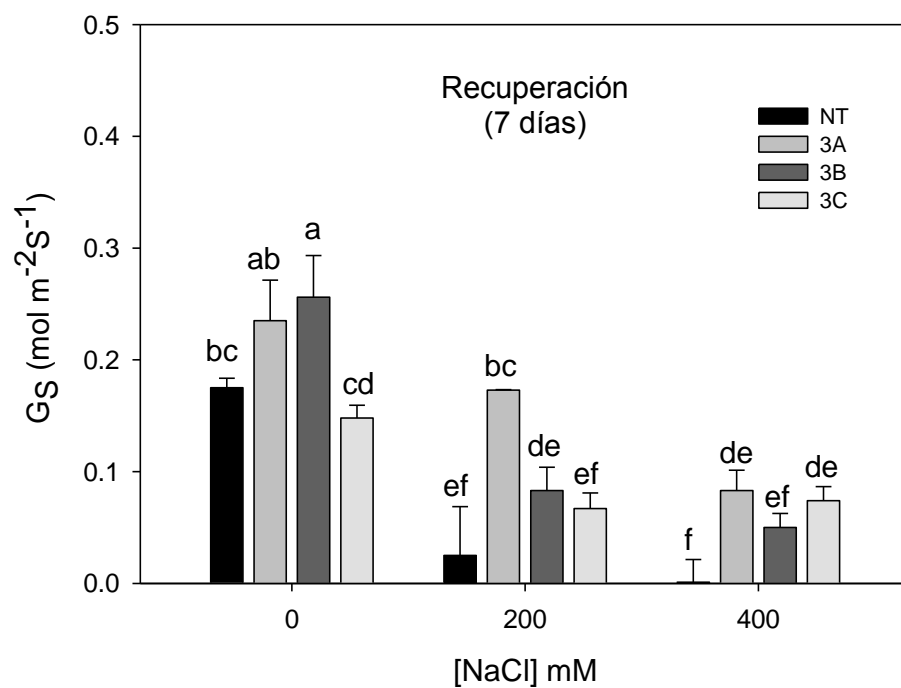


Figura 10. Conductancia estomática ( $G_s$ ) en plantas sometidas a estrés salino después de 7 días de recuperación. Las plantas se regaron de manera constante después de terminado el tratamiento de estrés salino, (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C. \*Diferente literal en una misma columna indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), media  $\pm$  EE,  $n=4$ .

En el día 0 del tratamiento de estrés salino se puede observar que las plantas no transformadas presentaron tasas de transpiración más altas en comparación con las plantas transformadas, mientras que las líneas de las plantas transformadas presentaron tasas de transpiración similares para ese día (Figura 11). En el día 1 del tratamiento de estrés salino todas las plantas presentaron disminución en la tasa de transpiración, sin embargo las plantas no transformadas presentaron reducción más significativa en comparación al día 0. Al día 1 las plantas transformadas redujeron 70% los rangos de transpiración para la concentración de 400 mM de NaCl. En el día 1 de estrés salino las plantas transformadas no presentaron rangos tan bajos de transpiración en el tratamiento de 400 mM en comparación a los testigos.

En la figura 11 se puede observar una disminución en la tasa de transpiración por efecto del tratamiento de estrés salino para el día 3 en todas las plantas. Las plantas no transformadas presentaron una disminución de 26% para la concentración de 200 mM de NaCl y de 50% para la concentración de 400 mM de NaCl en la tasa de transpiración en comparación al testigo, mientras que la línea 3A presentó una disminución de 51% para la concentración de 200 mM de NaCl y de 67% para la concentración de 400 mM de NaCl, la línea 3B presentó una disminución de 16% para la concentración de 200 mM de NaCl y de 47% para 400 mM de NaCl, mientras que la línea 3C presentó una disminución de 5% para la concentración de 200 mM y de 52% para 400 mM de NaCl. Al día 3 se puede observar que todas las plantas fueron más susceptibles al tratamiento de 400 mM de NaCl pues todas presentaron disminuciones significativas en comparación a sus testigos.

En el día 5 de tratamiento de estrés salino las plantas continuaron con el patrón de disminución en la tasa de transpiración, la disminución se observó en ambos tratamientos (Figura 11). Las plantas no transformadas presentaron una disminución de 60% para la concentración de 200 mM de NaCl y de 95% para la concentración de 400 mM de NaCl, las

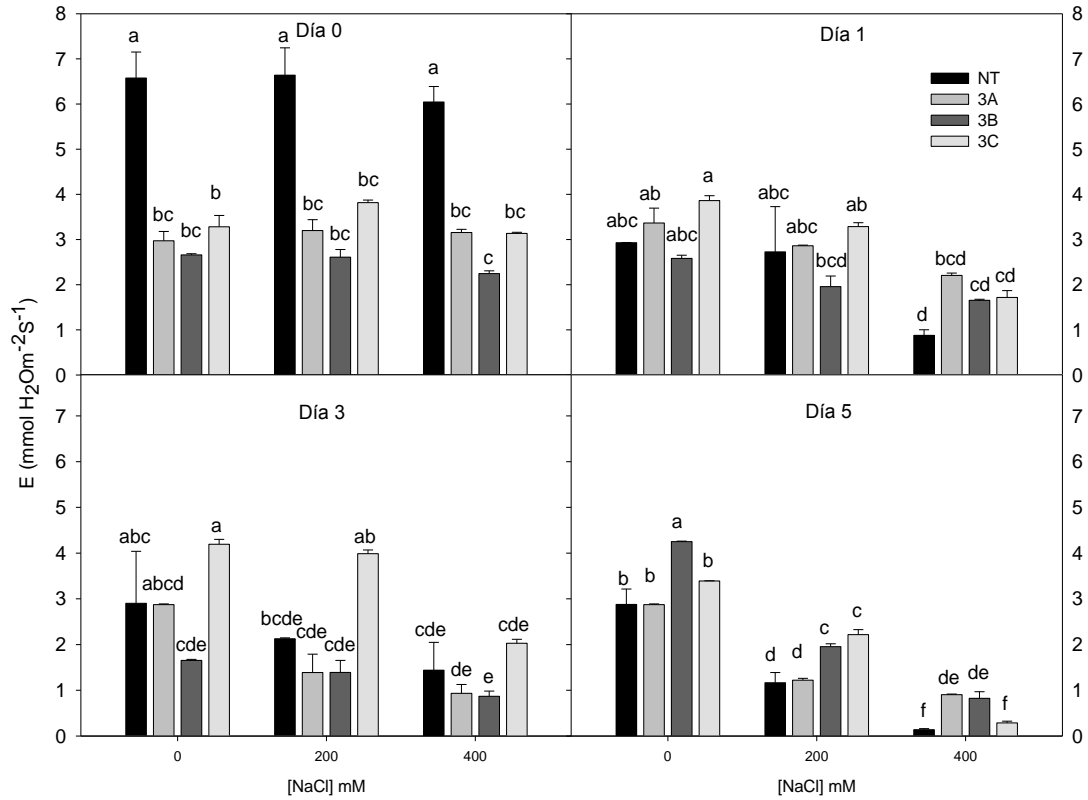


Figura 11. Efecto del estrés salino en la transpiración (E), (NT) plantas no transformadas. (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C. \*Diferente literal en una misma columna indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), media  $\pm$  EE,  $n=4$ .

líneas 3A y 3B presentaron una disminución de más de 50% en el tratamiento de 200 mM de NaCl y de más de 70% en el tratamiento de 400 mM de NaCl para la tasa de transpiración, mientras que la línea 3C presentó un efecto similar al de las plantas no transformadas en la concentración de 400 mM de NaCl en la tasa de transpiración en el último día del tratamiento de estrés salino (Figura 11).

En la Figura 12 se puede observar las tasas de transpiración de las plantas transformadas y no transformadas al día 7 de recuperación del tratamiento de estrés salino. Se encontró una disminución significativa en la tasa de transpiración para el testigo de la línea 3C, lo cual se puede asociar al estado de madurez de las plantas, ya que las plantas de esta línea fueron las primeras en espigar, mientras que las otras líneas 3A y 3B lo hicieron al final del tratamiento de estrés salino. Por otro lado, las plantas no transformadas no presentaron cambios en la tasa de transpiración al día 7 de recuperación, los valores permanecieron similares a los del último día del tratamiento de estrés salino. La línea 3A presentó una recuperación de 92% en comparación al testigo para el tratamiento de 200 mM de NaCl y de 53% para el de 400 mM de NaCl, la tasa de transpiración de la línea 3B presentó una reducción de 73% para el tratamiento de 200 mM de NaCl y de 79% para el de 400 mM de NaCl, mientras que la línea 3C presentó una reducción de 43% para el tratamiento de 200 mM de NaCl y de 49% para el de 400 Mm de NaCl.

En general, se observó un ligero incremento en la tasa de transpiración de las líneas transformadas a los 7 días de tratamiento de estrés salino, la recuperación fue mejor para el tratamiento con 200 mM de NaCl para la línea 3A, una concentración de NaCl tan alta como 400 mM provoca un daño irreversible en las plantas no transformadas, mientras que para las plantas transformadas reduce significativamente sus rangos de transpiración aun con la transformación (Figura 12).

El trigo es una planta C3 por lo que la transpiración afecta directamente la concentración de agua en la hoja y en toda la planta (Azcón-Bieto, 1983).

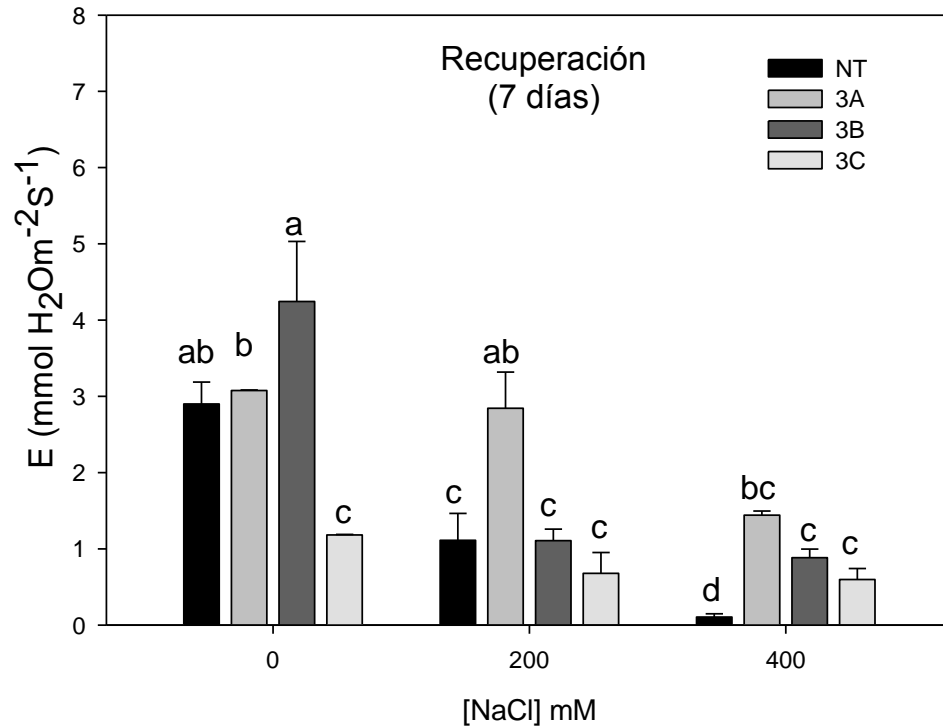


Figura 12. Transpiración (E) en plantas sometidas a estrés salino después de 7 días de recuperación. Las plantas se regaron de manera constante después de terminado el tratamiento de estrés salino. (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C \*Diferente literal en una misma columna indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), media  $\pm$  EE, n=4

Para tolerar el estrés salino las plantas debieron reducir su tasa de transpiración y de ésta manera reducir la pérdida de agua por los estomas.

En cuanto a la eficiencia de uso de agua de las plantas se calculó mediante  $A/E$  (A) asimilación de  $CO_2$  y (E) transpiración, todas las plantas presentaron disminución en la eficiencia de uso de agua en comparación a sus testigos en las concentraciones de 200 y 400 mM de NaCl; sin embargo las plantas no transformadas redujeron significativamente la  $A/E$  durante todos los días del tratamiento de estrés salino (Figura 13). En el día 5 del tratamiento de estrés salino se puede observar una pérdida total de la eficiencia de uso de agua de las plantas no transformadas en el tratamiento de 400 mM NaCl en comparación a su testigo. Por otro lado, las plantas transformadas no presentaron disminuciones significativas de la eficiencia de uso agua hasta el día 5 del tratamiento de estrés salino.

A los 7 días de la recuperación del tratamiento de estrés salino se puede observar que las plantas transformadas presentan una disminución significativa de la eficiencia de uso de agua para la concentración de 400 mM de NaCl (Figura 14) siendo mayor para la línea 3C la cual disminuyó más del 80% en comparación al testigo. Mientras que las plantas no transformadas presentaron una pérdida total de la eficiencia de uso de agua para la concentración de 400 mM de NaCl (Figura 14). Esto indica que las plantas transformadas pueden sobrevivir a una salinidad moderada de 200 mM de NaCl y pueden tolerar una salinidad extrema de 400 mM.

En el día 0 del tratamiento de estrés salino las líneas 3A y 3C presentaron rangos similares de concentración de  $CO_2$  intercelular ( $C_i$ ) mientras que la línea RB presentó valores menores (Figura 15). En el día 1 de tratamiento se observó un ligero aumento en  $C_i$  en todas las plantas en los tratamientos de 200 mM y 4000 mM de NaCl en comparación a los testigos. En el día 3 del tratamiento de estrés salino las plantas no transformadas y líneas 3A y 3C

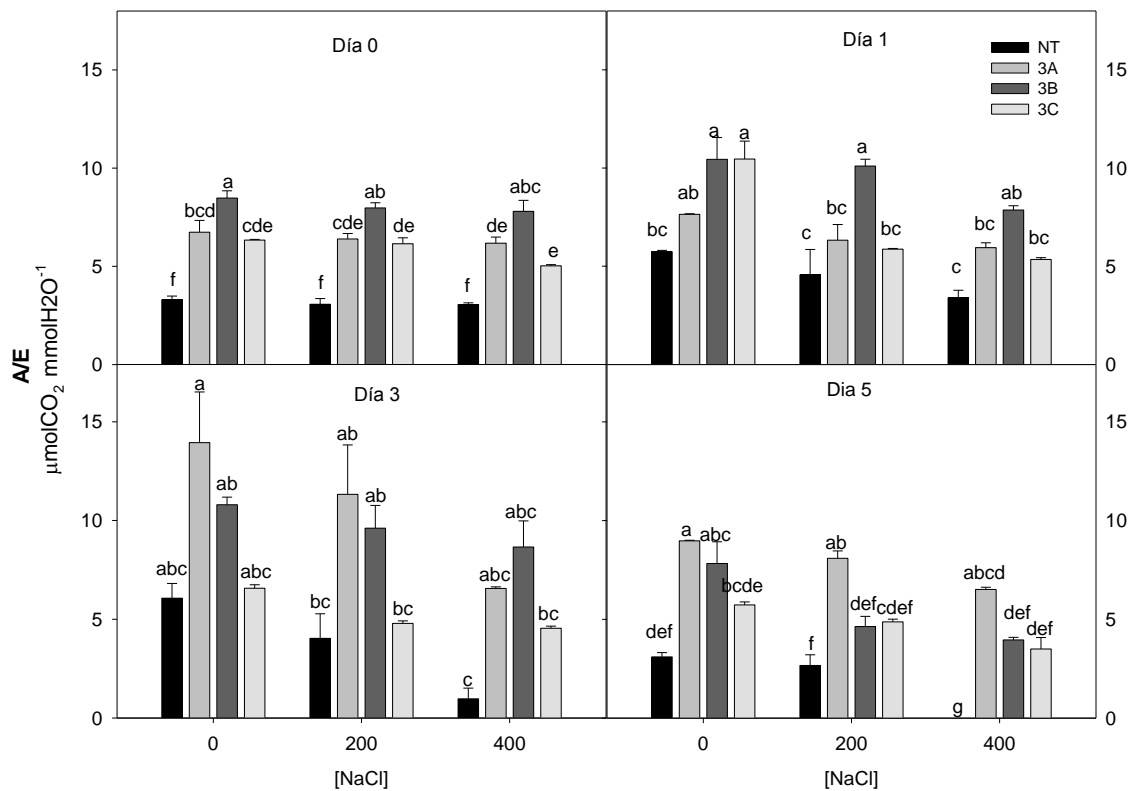


Figura 13. Eficiencia en uso de agua (A/E) durante tratamiento de estrés salino. (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C. \*Diferente literal en una misma columna indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), media  $\pm$  EE,  $n=4$ .

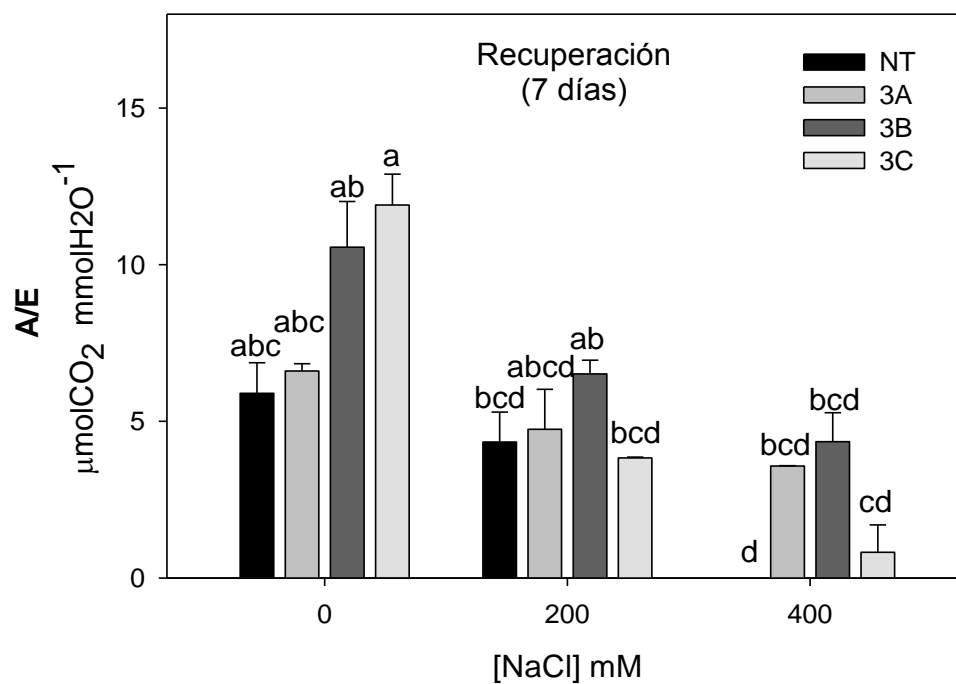


Figura 14. Eficiencia en uso de agua (A/E) en plantas sometidas a estrés salino a los 7 días de recuperación. Las plantas se regaron de manera constante después de terminado el tratamiento de estrés salino. (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C. \*Diferente literal en una misma columna indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), media  $\pm$  EE,  $n=4$



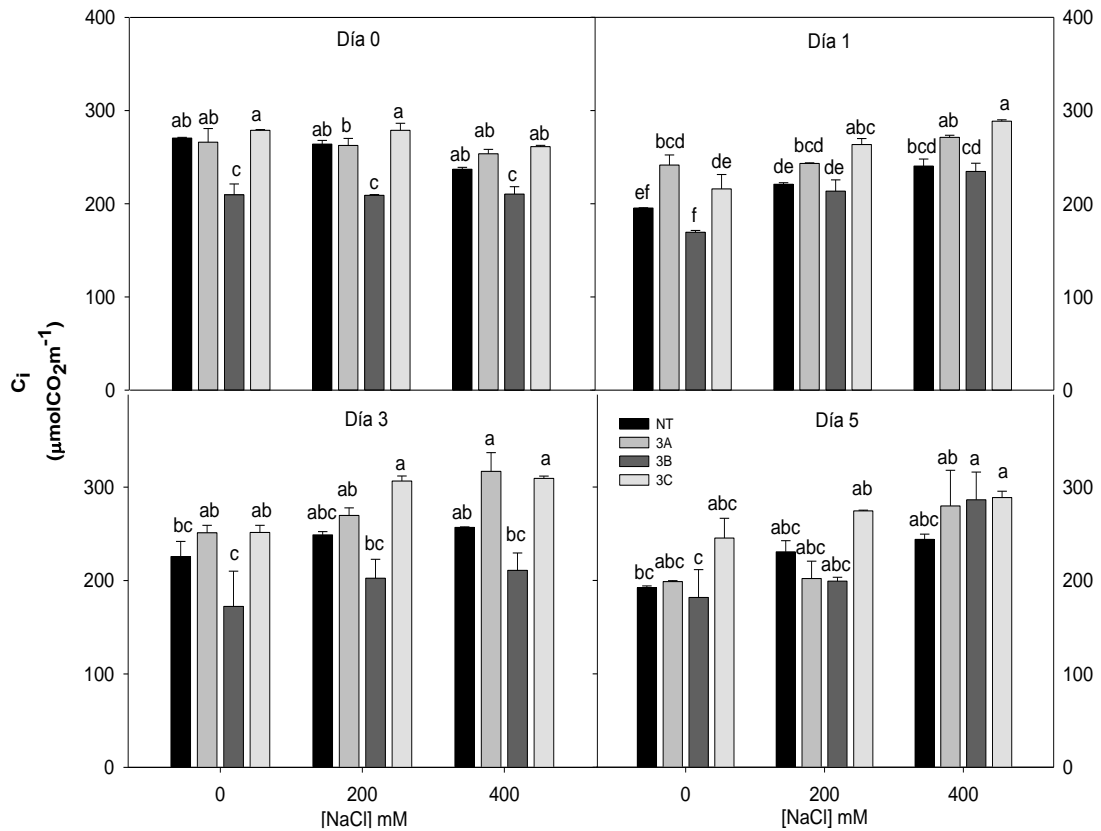


Figura 15. Efecto del estrés salino en la concentración de CO<sub>2</sub> intercelular (C<sub>i</sub>). (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C. \*Diferente literal en una misma columna indica diferencias significativas (P < 0.05), media ± EE, n=4.

aumentaron significativamente 26% y 23% los valores de  $C_i$  en el tratamiento con 400 mM de NaCl en comparación a los testigos, mientras que las plantas no transformadas y la línea 3B mantuvieron sus valores de  $C_i$  similares en ambas concentraciones de NaCl.

Al día 5 del tratamiento de estrés salino la  $C_i$  mostró un aumento significativo en comparación a los testigos. Las plantas no transformadas presentaron un aumento de 20% en el tratamiento de 200 mM de NaCl y un aumento de 27% para el tratamiento de 400 mM de NaCl. Mientras que la línea 3A presentó solo aumento significativo en  $C_i$  con el tratamiento de 200 mM de NaCl, y un aumento significativo de 41% en el tratamiento de 400 mM de NaCl (Figura 15). La línea 3B presentó un aumento de 10% para el tratamiento de 200 mM de NaCl en el valor de  $C_i$  y un aumento de 58% para el de 400 mM de NaCl, mientras que la línea 3C presentó solo un aumento significativo de 18% en el tratamiento de 400 mM de NaCl.

En la Figura 16 se muestran los datos de  $C_i$  a los 7 días de recuperación del tratamiento de estrés salino. Todas las plantas presentaron aumentos en la  $C_i$  en comparación al testigo, los rangos fueron similares en los tratamientos de 200 mM y 400 mM de NaCl con excepción de la línea 3B que presentó rangos menores de  $C_i$ , además fue la que presentó el valor más bajo de  $C_i$  en el testigo.  $C_i$  aumentó al transcurrir los días de tratamiento de estrés salino incluyendo los días del tratamiento de recuperación a diferencia de las otras variables de intercambio de gases.

Se calculó la eficiencia en fijación del carbono mediante la ecuación  $A/C_i$  (A) Asimilación de  $CO_2$  y ( $C_i$ ) Concentración de  $CO_2$  intercelular (Figura 17), este parámetro fue más alto para las líneas de plantas transformadas sometidas a estrés salino (200 y 400 mM) durante todos los días del tratamiento. Sin embargo a partir del día 3 se observa que la  $A/C_i$  empieza a disminuir drásticamente también para las plantas transformadas para la

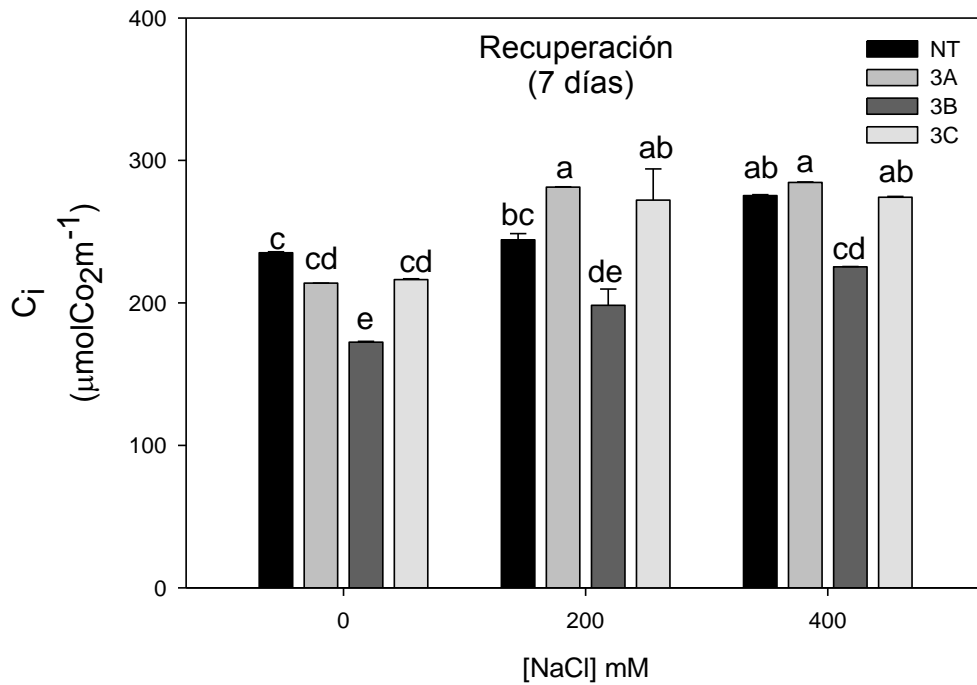


Figura 16. Concentración de CO<sub>2</sub> intercelular (C<sub>i</sub>) en plantas sometidas a estrés salino a los 7 días de recuperación. Las plantas se regaron de manera constante después de terminado el tratamiento de estrés salino. (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C. \*Diferente literal en una misma columna indica diferencias significativas (P<0.05), media ± EE, n=4

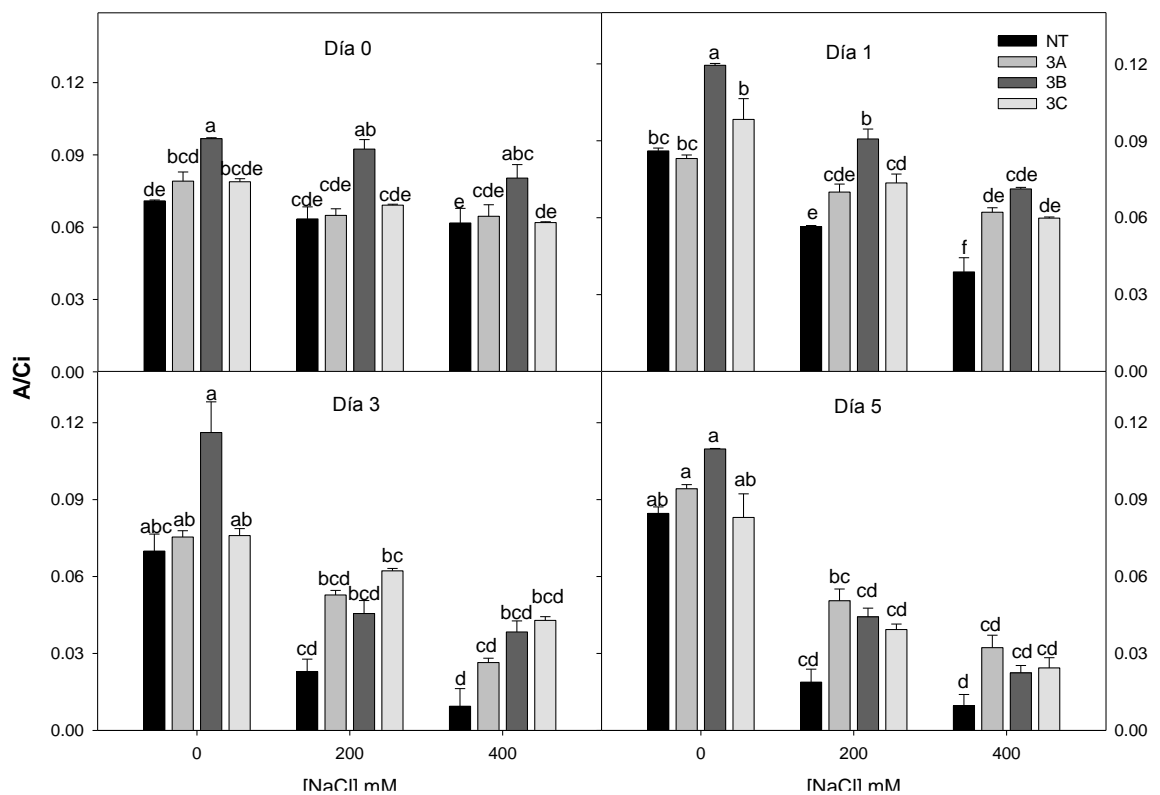


Figura 17. Eficiencia en la fijación del carbono ( $A/C_i$ ) durante tratamiento de estrés salino. (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C. \*Diferente literal en una misma columna indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), media  $\pm$  EE,  $n=4$ .

concentración de 400 mM de NaCl con respecto a los testigos. Todas las líneas de las plantas transformadas redujeron drásticamente hasta un 65% la eficiencia de fijación de CO<sub>2</sub> en comparación con los testigos. Las plantas no transformadas por otro lado redujeron un 87% su eficiencia con respecto a su testigo. Por lo que las plantas transformadas presentaron mayor eficiencia en la fijación de CO<sub>2</sub> durante todo el tratamiento de estrés salino (200 y 400 mM).

En la Figura 18 se muestra la eficiencia en la fijación de carbono de las plantas al día 7 de recuperación. Las plantas no transformadas presentaron una ligera mejoría en éste parámetro (80%) para el tratamiento de 200 mM de NaCl y una pérdida total en la capacidad de fijar el CO<sub>2</sub> en de 400 mM de NaCl con respecto al testigo. Por otro lado las plantas transformadas presentaron mayores tasas de fijación de CO<sub>2</sub> a los 7 días de recuperación del tratamiento de estrés salino en comparación a las plantas no transformadas pues solamente presentaron una disminución significativa de 68% para la línea 3B en el tratamiento de 400 mM de NaCl.

### Fluorescencia

En muchos estudios se ha utilizado la variable Fv/Fm (eficiencia fotoquímica primaria del PSII) de la clorofila a, como un indicador de estrés ambiental (Adams y Demming-Adams, 2004). En la Figura 19 se puede observar que al día 0 del tratamiento de estrés salino no hay diferencias significativas en la variable Fv/Fm de las plantas transformadas y no transformadas, además presentaron valores cercanos a 0.8 y superiores lo que indica que no había daños en el PSII al principio del tratamiento.

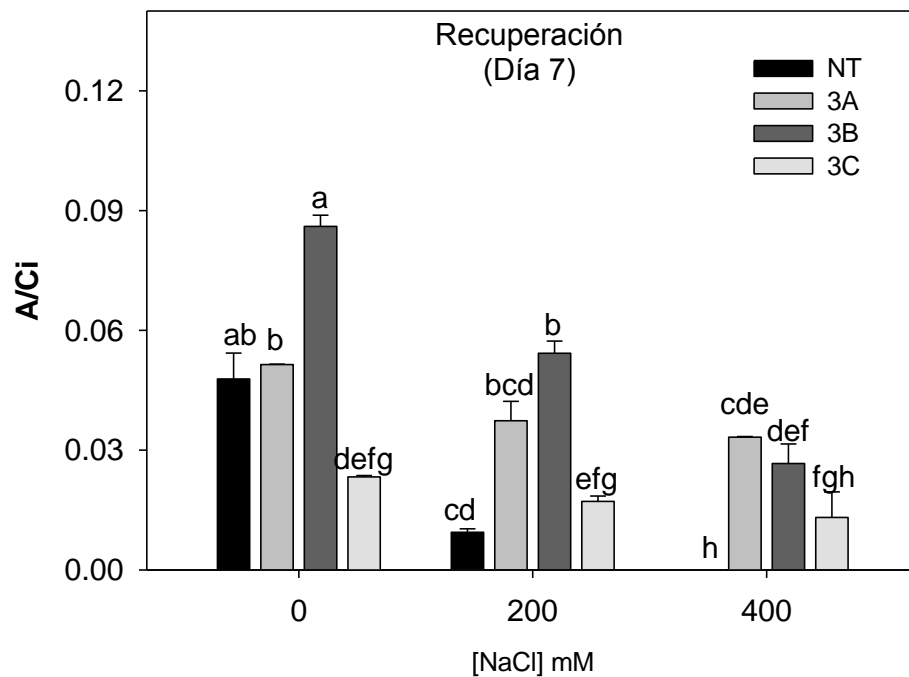


Figura 18. Eficiencia en la fijación del carbono (A/Ci) en plantas sometidas a estrés salino a los 7 días de recuperación. Las plantas se regaron de manera constante después de terminado el tratamiento de estrés salino. (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C. \*Diferente literal en una misma columna indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), media  $\pm$  EE,  $n = 4$ .

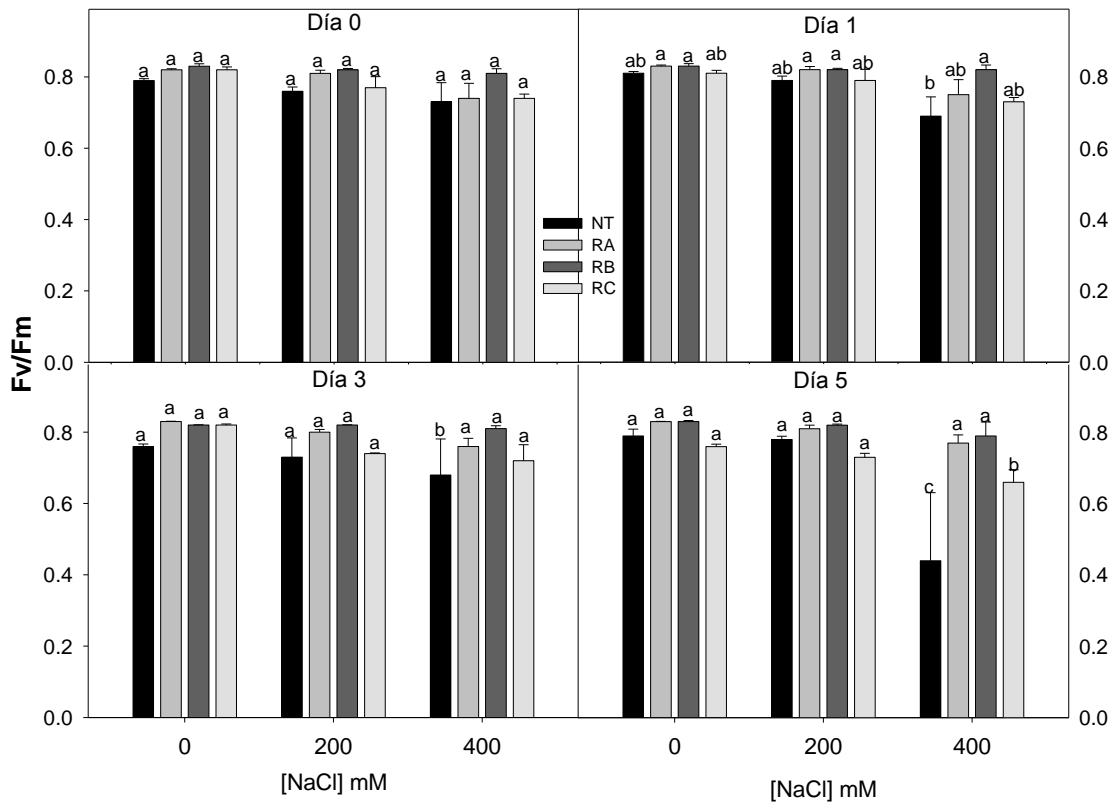


Figura 19. Efecto del tratamiento de estrés salino en la eficiencia del PSII ( $F_v/F_m$ ). (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C. \*Diferente literal en una misma columna indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), media  $\pm$  EE,  $n=4$ .

En el día 1 del tratamiento de estrés salino las plantas transformadas y no transformadas presentaron una disminución de 1 y 2% en la variable Fv/Fm en la concentración de 200 mM de NaCl con respecto al testigo, mientras que en el tratamiento de 400 mM las líneas 3A y 3C presentaron una disminución del 10%, las plantas no transformadas, por otro lado, presentaron una disminución de 14% para el tratamiento 400 mM de NaCl (Figura 19). En el día 3 y 5 del tratamiento de estrés salino las plantas transformadas permanecieron dentro de los mismos valores de Fv/Fm a diferencia de las plantas no transformadas cuyos rangos de Fv/Fm disminuyeron 11% en el tratamiento de 400 mM de NaCl en el día 3 y una disminución de 44% en el día 5 para ese mismo tratamiento. La línea 3C de las plantas transformadas presentó una mayor disminución la cual fue de 13% para el día 5 respecto al testigo en el tratamiento de 400 mM de NaCl.

En la Figura 20 se puede observar que al día 7 de recuperación del tratamiento de estrés salino las líneas 3A y 3C mantuvieron constantes los valores para Fv/Fm en el tratamiento de 200 mM de NaCl. Mientras que la línea 3B presentó una disminución de un 22% en la variable Fv/Fm en el tratamiento de 400 mM de NaCl. Por otro lado las plantas no transformadas presentaron una disminución de un 80% para Fv/Fm, lo cual indica un daño en el fotosistema II.

La eficiencia del PSII se ve afectada en las plantas no transformadas desde el primer día de estrés salino (NaCl 400 mM), en cambio las plantas transformadas muestran poco cambio en éste parámetro a concentraciones de 200 mM de NaCl. Cambios significativos se observan solo en las plantas sometidas a 400 mM de NaCl donde tanto al día 3 como al día 5 de estrés las plantas transformadas mantienen una alta eficiencia del PSII. Las plantas de trigo transformadas con el gen para la enzima bifuncional *TPS1-TPS2* bajo condiciones de salinidad son más eficientes en su fotoquímica primaria que las plantas de arroz transformadas con una fusión similar (Garg *et al.*, 2002; Jang *et al.*, 2003).



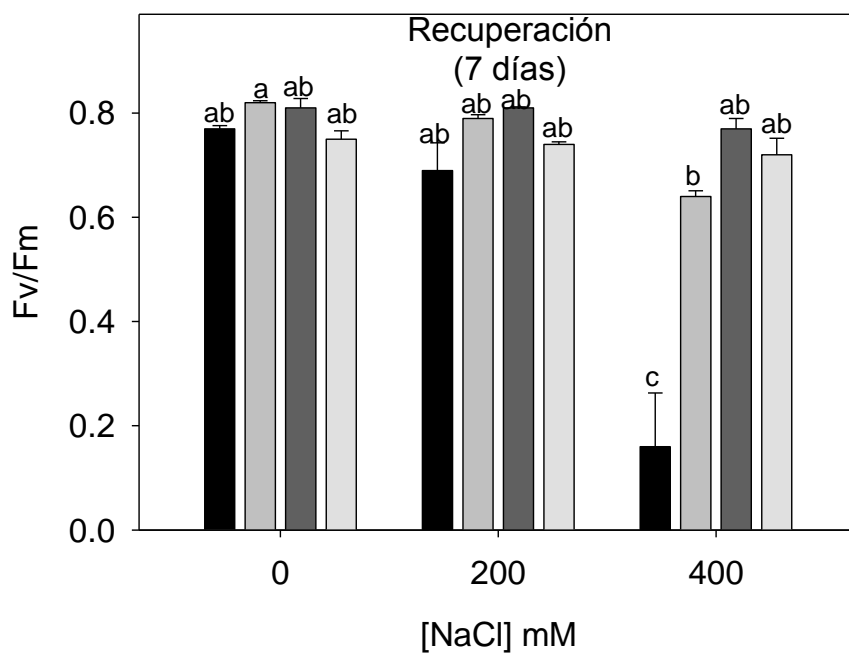


Figura 20. Eficiencia del PSII (Fv/Fm) a los 7 días de recuperación del tratamiento de estrés salino. (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C.. \*Diferente literal en una misma columna indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), media  $\pm$  EE,  $n=4$ .

En la Figura 21 se muestra el efecto del tratamiento de estrés salino en los parámetros de fluorescencia (flujos específicos expresados por área) en plantas transformadas y no transformadas expresadas en gráficas radiales en el día 1 de tratamiento. Todas las plantas presentaron alteraciones en los radios de los flujos específicos en los tratamientos de 200 mM y 400 mM de NaCl en comparación al testigo. Las plantas no transformadas presentaron un incremento en el parámetro Dio/Cs (flujo de disipación de energía) y una disminución en los parámetros de ETo/Cs (transporte de electrones), TRo/Cs (flujo de energía transferida al centro de reacción) y Fm (fluorescencia máxima), la disminución de los parámetros fue más significativa para el tratamiento de 400 mM de NaCl.

En el día 1 del tratamiento de estrés salino, las líneas 3A y 3C también presentaron alteraciones en los radios de los flujos específicos, se presentó un aumento significativo para ambas líneas (3A y 3C) en el parámetro Dio/Cs en el tratamiento de 400 mM de NaCl y ligeras disminuciones en los parámetros de ABS/Cs, TRo/Cs y Fm en relación al testigo, mientras que los demás parámetros permanecieron dentro del radio 1 (Figura 21). Por otro lado los parámetros de flujos específicos de la línea 3B de plantas transformadas permanecieron muy similares a los del testigo en ambas concentraciones de NaCl (200 y 400 mM).

En el día 3 del tratamiento de estrés salino se puede observar el efecto de la salinidad en los flujos específicos en las plantas no transformadas y líneas 3A y 3C de plantas transformadas (Figura 22). Las plantas no transformadas presentaron un aumento de 1 en el parámetro de Dio/Cs en el día 3 del tratamiento de estrés salino y al mismo tiempo presentaron disminución en los parámetros de ABS/Cs y de TRo/Cs. Las líneas 3A y 3C también presentaron alteraciones en el radio de los flujos específicos como un aumento de 1 en el parámetro Dio/Cs para el tratamiento de 400 mM y disminuciones en los parámetros ABS/Cs y TRo/Cs. Por otro lado los flujos específicos

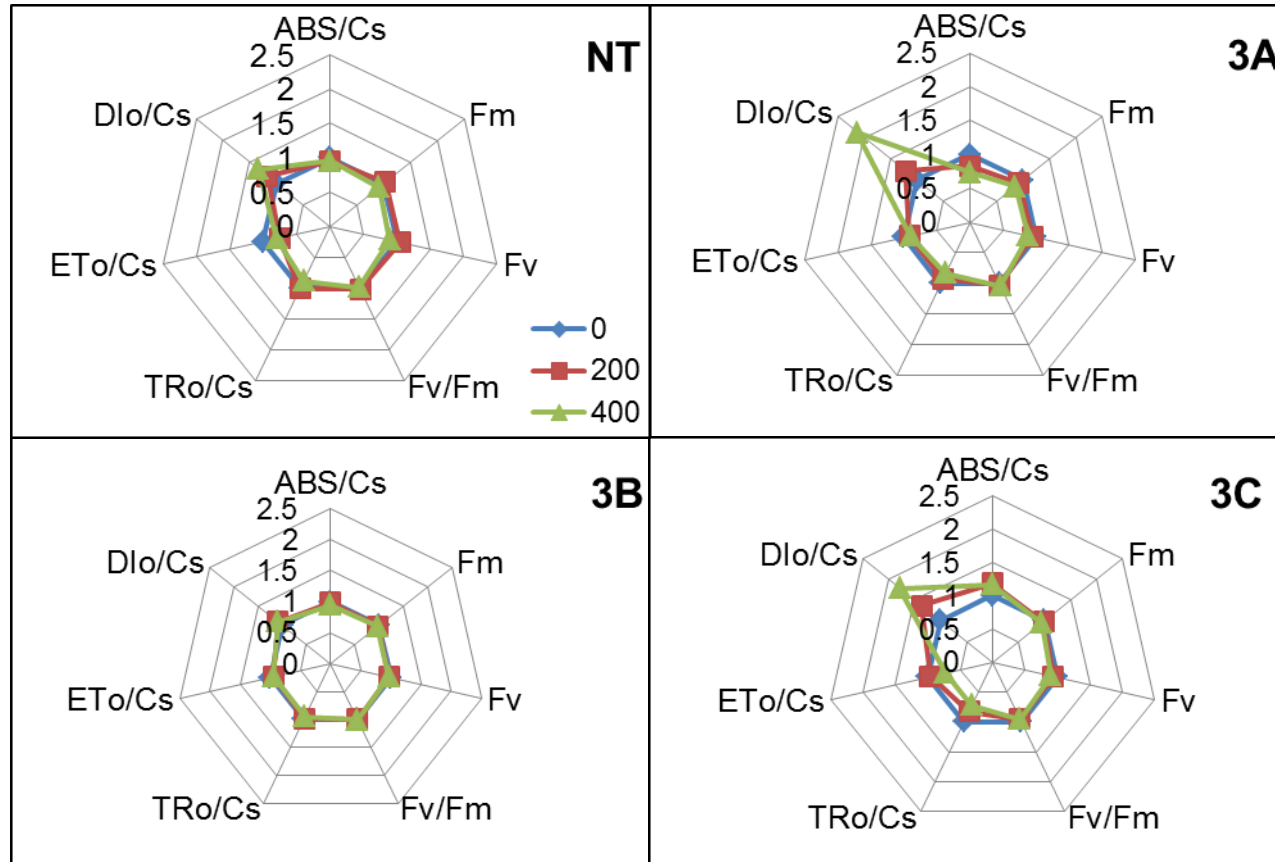


Figura 21. Efecto del tratamiento de estrés salino al día 1 en las variables de fluorescencia, (ABS) flujo de fotones absorbido por pigmento antena (Fm) valor máximo de la fluorescencia, (Fv) fluorescencia variable en hojas adaptadas a la obscuridad ( $Fv = Fm - F_o$ ), (Tro) flujo de energía transferida al centro de reacción, (ETo) transporte de electrones que conduce a la fijación de  $CO_2$ , (Dio) flujo de disipación de energía no atrapada como calor o transferida a otros sistemas no fluorescentes, (Fv/Fm) eficiencia de la fotoquímica primaria del PSII; (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C.

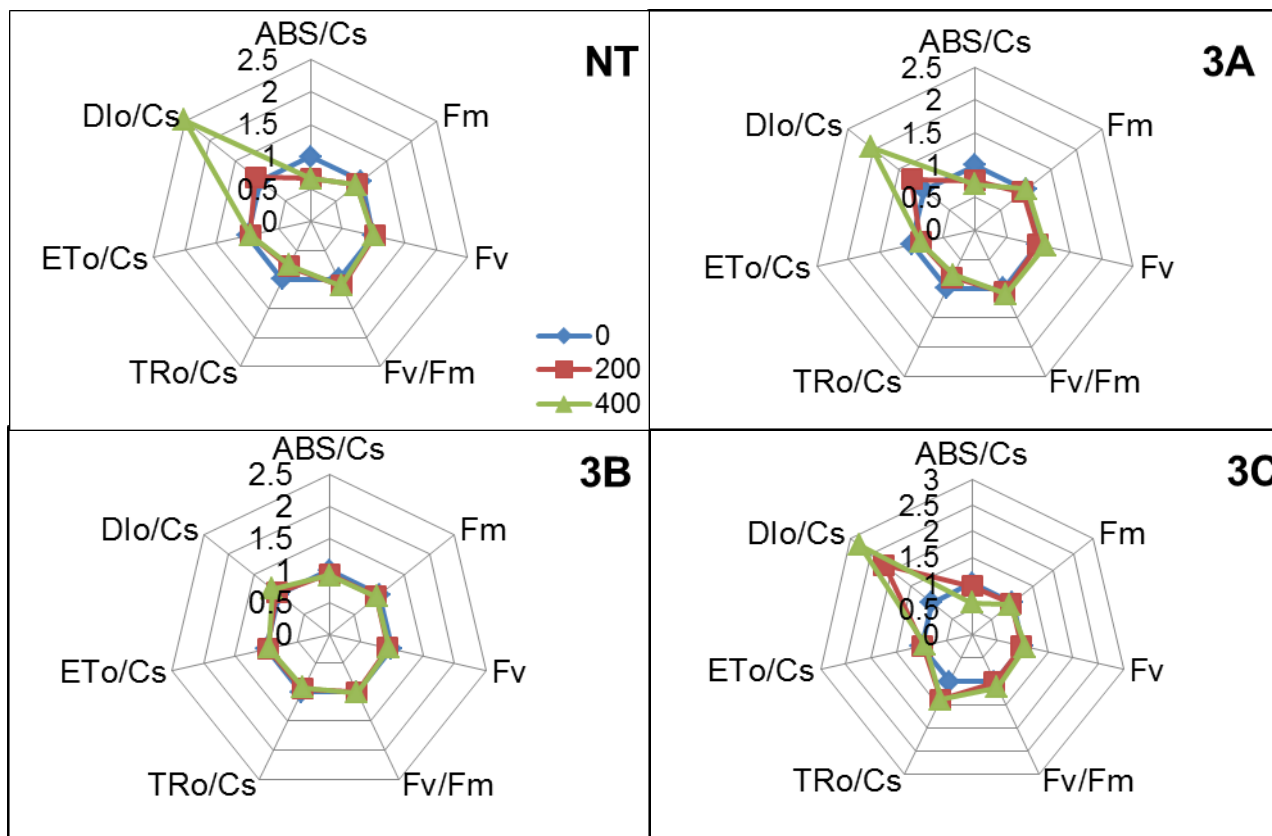


Figura 22. Efecto del tratamiento de estrés salino al día 3 en las variables de fluorescencia, (ABS) flujo de fotones absorbido por pigmento antena (Fm) valor máximo de la fluorescencia, (Fv) fluorescencia variable en hojas adaptadas a la obscuridad ( $Fv = Fm - F_0$ ), (TRo) flujo de energía transferida al centro de reacción, (ETo) transporte de electrones que conduce a la fijación de  $CO_2$ , (Dio) flujo de disipación de energía no atrapada como calor o transferida a otros sistemas no fluorescentes, (Fv/Fm) eficiencia de la fotoquímica primaria del PSII; (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C.

por área medida de la línea 3B permanecieron muy similares al testigo, lo que sugiere que la salinidad no tuvo un efecto considerable en el estado del PSII de la planta al día 3 del tratamiento de estrés salino. En el día 3 del tratamiento de estrés salino los radios de los flujos específicos expresados por área (Cs) mostraron un comportamiento similar en todas las plantas ya que se observó que cuando el parámetro Dio/Cs aumentó, los parámetros ABS/Cs, TRo/Cs y ETo/Cs tendieron a disminuir, mientras que la línea 3B presentó valores similares al testigo.

En el día 5 del tratamiento de estrés salino se observó que las plantas transformadas fueron las que más redujeron los parámetros de flujos específicos ABS/Cs, ETo/Cs, TRo/Cs, además presentaron una reducción en las variables Fm y FV por efecto del tratamiento con 400 mM de NaCl. Al mismo tiempo las plantas no transformadas presentaron un aumento en el parámetro Dio/Cs con respecto al testigo (Figura 23). Las líneas transformadas 3A y 3C también presentaron variaciones en los parámetros de fluorescencia, las cuales fueron más significativas para la concentración de 400 mM de NaCl al igual que en los otros días del tratamiento de estrés salino (Figura 21 y 22). La línea 3B presentó variaciones en los parámetros de fluorescencia hasta el día 5 del tratamiento de estrés salino, donde solamente se observó un aumento de 0.6 en el parámetro Dio/Cs.

En la Figura 24 se puede observar que los radios de las variables de fluorescencia a los 7 días de la recuperación del tratamiento de estrés salino presentan variaciones en todas las plantas con respecto a los testigos en la concentración de 400 mM de NaCl. Sin embargo esta variación es mayor para las plantas no transformadas. La variable Dio/Cs se muestra más alta en comparación a los testigos. Mientras que las líneas transformadas 3B y 3A permanecen muy estables en comparación a los testigos y se muestran más estables en comparación al día 5 del tratamiento de estrés salino (Figura 24).

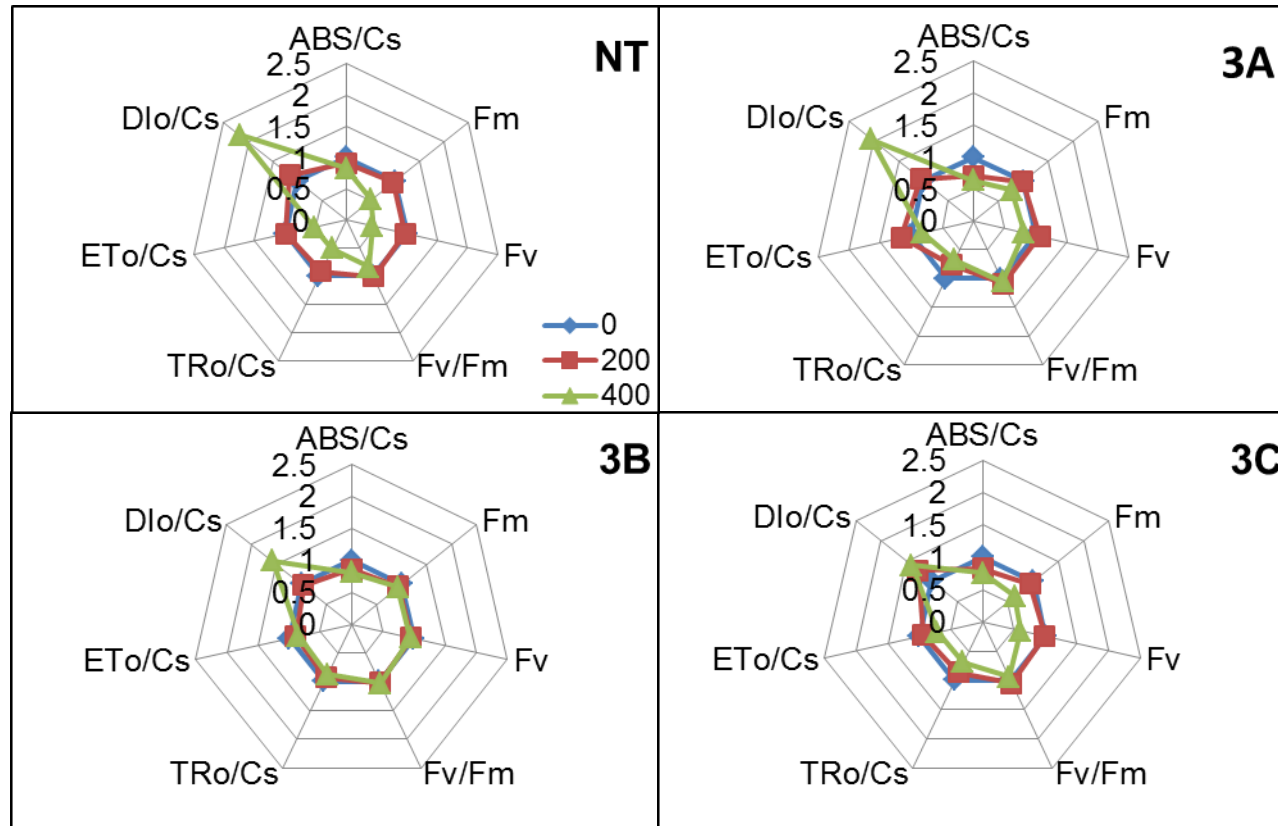


Figura 23. Efecto del tratamiento de estrés salino al día 5 en las variables de fluorescencia, (ABS) flujo de fotones absorbido por pigmento antena (Fm) valor máximo de la fluorescencia, (Fv) fluorescencia variable en hojas adaptadas a la obscuridad ( $Fv = Fm - F_0$ ), (TRo) flujo de energía transferida al centro de reacción, (ETo) transporte de electrones que conduce a la fijación de  $CO_2$ , (Dio) flujo de disipación de energía no atrapada como calor o transferida a otros sistemas no fluorescentes, (Fv/Fm) eficiencia de la fotoquímica primaria del PSII; (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C.

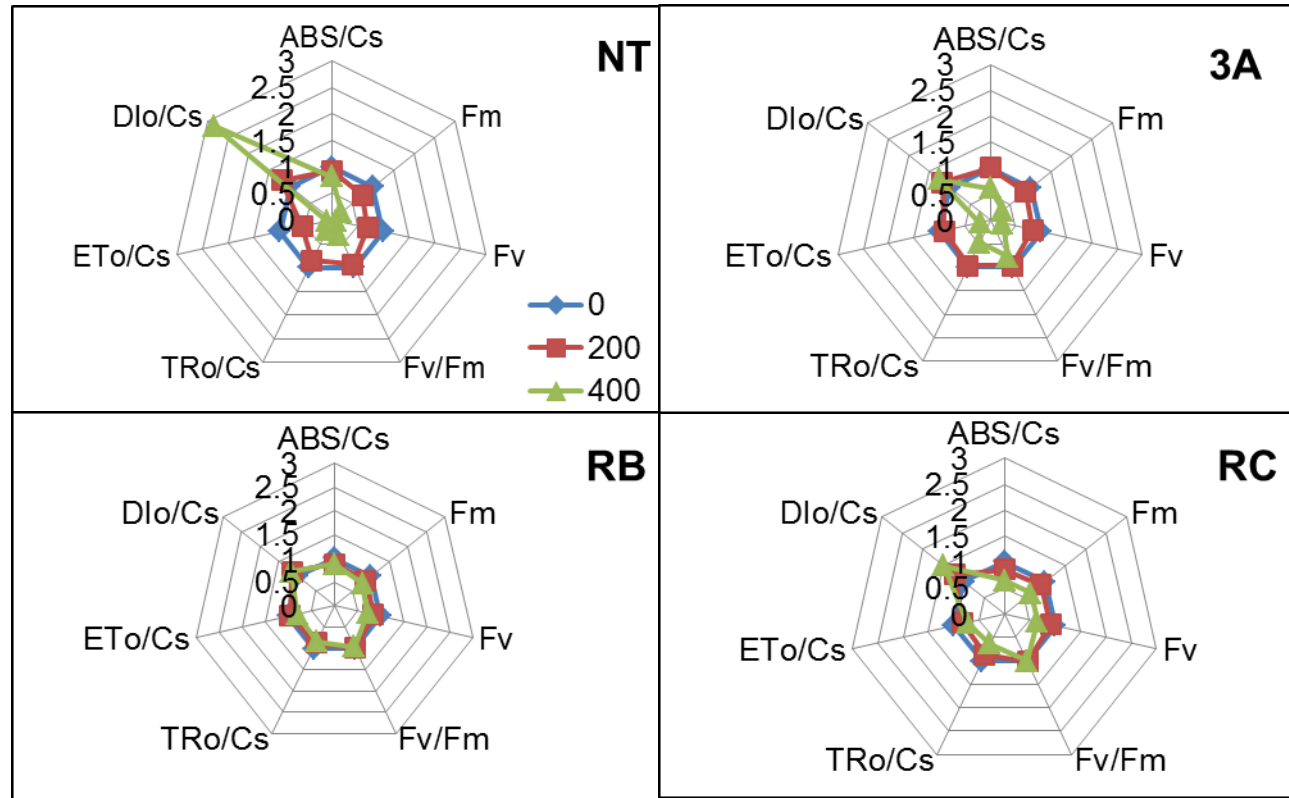


Figura 24. Variables de fluorescencia a los 7 días de recuperación del tratamiento de estrés salino, (ABS) flujo de fotones absorbido por pigmento de antena (Fm) valor máximo de la fluorescencia, (Fv) fluorescencia variable en hojas adaptadas a la oscuridad ( $Fv = Fm - F_0$ ), (TRo) flujo de energía transferida al centro de reacción, (ETo) transporte de electrones que conduce a la fijación de  $CO_2$ , (Dio) flujo de disipación de energía no atrapada como calor o transferida a otros sistemas no fluorescentes, (Fv/Fm) eficiencia de la fotoquímica primaria del PSII; (NT) plantas no transformadas, (3A) plantas transformadas línea RD29A-3A, (3B) plantas transformadas línea RD29A-3B, (3C) plantas transformadas línea RD29A-3C.

Por otro lado la concentración de 200 mM de NaCl no parece tener un efecto tan dramático para las plantas, mientras que la concentración de 400 mM puede causar un daño permanente en el PSII de las plantas no transformadas.

Jang y colaboradores (2003) expusieron plántulas de arroz transformadas con una enzima bifuncional (TPSP) a 150 M de NaCl durante 2 horas y midieron la eficiencia del PSII ( $F_v/F_m$ ) encontrando que ésta era entre 15 y 19% más alta en las plantas transformadas respecto al control. Garg y colaboradores (2002) encontraron en plantas de arroz que el mismo parámetro disminuía entre 29 y 37% en plantas bajo estrés salino (100 mM NaCl). Las plantas de trigo en cambio mostraron una mayor eficiencia del PSII ya que con 400 mM de NaCl las plantas transformadas presentaron entre 50 y 100% mayor eficiencia que las plantas no transformadas sometidas a la misma concentración de sal.

#### Evaluación de la biomasa seca

En el cuadro 5 se observa el efecto del tratamiento de salinidad con 0, mM, 200 mM y 400 mM de NaCl para las variables de biomasa seca total, tamaño y peso de tallo, tamaño y peso de espiga, tamaño y peso de raíz y número de semillas de plantas transformadas RD29A líneas 3A, 3B y 3C y plantas no transformadas. Las plantas no transformadas presentaron una disminución de 2% en la biomasa seca total para el tratamiento de 200 mM de NaCl y una disminución de 38% para el tratamiento de 400 mM de NaCl en comparación al testigo, la línea 3A presentó una disminución de 21% para el tratamiento de 200 mM y una disminución de 4% para el tratamiento de 400 mM de NaCl en la biomasa total seca en comparación al testigo; la línea 3B presentó un ligero aumento en la biomasa total seca para los tratamientos de 200 mM y 400 mM de NaCl, mientras que la línea 3C presentó una disminución de la biomasa total seca solamente para el tratamiento de 400 mM de NaCl en comparación al testigo. Solamente las plantas no transformadas presentaron una disminución considerable en la biomasa total seca en comparación con las líneas de las plantas no transformadas (Cuadro 5).



Cuadro 5. Efecto del estrés salino en la biomasa seca de plantas RD29A y no transformadas.

[NaCl] ] mM	Planta	Biomasa Total(gr)	Tallo (cm)	Espiga		Raíz		No. de semillas
				Gr	Cm	Gr	Cm	
<b>0</b>	NT	1.017 <sup>abc</sup> ± 0.098	39.59 <sup>ab</sup> ± 1.063	0.761 <sup>a</sup> ± 0.084	6.4 <sup>ab</sup> ± 0.244	0.118 <sup>abc</sup> ± 0.019	19.3 <sup>abc</sup> ± 2.712	21 <sup>a</sup> ± 1.46
	3A	0.986 <sup>abc</sup> ± 0.035	36.35 <sup>ab</sup> ± 1.04	0.636 <sup>abcd</sup> ± 0.032	5.45 <sup>abc</sup> ± 0.337	0.106 <sup>abc</sup> ± 0.012	27.6 <sup>ab</sup> ± 2.381	14 <sup>abc</sup> ± 1.12
	3B	0.757 <sup>cd</sup> ± 0.066	33.05 <sup>ab</sup> ± 0.857	0.482 <sup>bcde</sup> ± 0.048	5.45 <sup>bc</sup> ± 0.240	0.132 <sup>abc</sup> ± 0.013	29.35 <sup>a</sup> ± 1.394	18 <sup>abc</sup> ± 1.39
	3C	1.156 <sup>ab</sup> ± 0.063	38.7 <sup>a</sup> ± 1.891	0.731 <sup>abc</sup> ± 0.038	6.1 <sup>abc</sup> ± 0.339	0.225 <sup>a</sup> ± 0.032	39.59 <sup>abc</sup> ± 1.063	19 <sup>ab</sup> ± 1.49
<b>200</b>	NT	0.992 <sup>abc</sup> ± 0.094	33.05 <sup>ab</sup> ± 1.20	0.639 <sup>abcd</sup> ± 0.056	6.03 <sup>abc</sup> ± 0.270	0.132 <sup>abc</sup> ± 0.016	15.8 <sup>bc</sup> ± 2.924	10 <sup>c</sup> ± 1.33
	3A	0.777 <sup>bcd</sup> ± 0.079	36.9 <sup>ab</sup> ± 1.70	0.446 <sup>cde</sup> ± 0.034	5.2 <sup>c</sup> ± 0.2	0.07 <sup>c</sup> ± 0.009	19.9 <sup>abc</sup> ± 2.141	13 <sup>bc</sup> ± 1.24
	3B	0.852 <sup>abcd</sup> ± 0.077	32.8 <sup>b</sup> ± 1.329	0.526 <sup>bcde</sup> ± 0.037	5.4 <sup>bc</sup> ± 0.22	0.175 <sup>abc</sup> ± 0.019	24.7 <sup>ab</sup> ± 2.916	13 <sup>bc</sup> ± 1.16
	3C	1.176 <sup>a</sup> ± 0.090	38.37 <sup>ab</sup> ± 1.63	0.719 <sup>ab</sup> ± 0.057	6.2 <sup>abc</sup> ± 0.3	0.168 <sup>ab</sup> ± 0.030	38.37 <sup>abc</sup> ± 1.638	21 <sup>a</sup> ± 1.77
<b>400</b>	NT	0.626 <sup>d</sup> ± 0.644	31.44 <sup>b</sup> ± 1.903	0.34 <sup>e</sup> ± 0.047	5.27 <sup>bc</sup> ± 0.307	0.08 <sup>c</sup> ± 0.015	13.2 <sup>c</sup> ± 2.042	4 <sup>d</sup> ± 0.5
	3A	0.948 <sup>abcd</sup> ± 0.065	35.65 <sup>ab</sup> ± .605	0.583 <sup>abcde</sup> ± 0.035	6.4 <sup>abc</sup> ± 0.221	0.108 <sup>bc</sup> ± 0.017	23.85 <sup>ab</sup> ± 4.690	16 <sup>c</sup> ± 1.29
	3B	0.854 <sup>bcd</sup> ± 0.066	31.88 <sup>ab</sup> ± 1.40	0.486 <sup>de</sup> ± 0.042	6.91 <sup>a</sup> ± 0.243	0.185 <sup>abc</sup> ± 0.020	20.61 <sup>abc</sup> ± 1.60	14 <sup>c</sup> ± 1.46
	3C	1.066 <sup>abc</sup> ± 0.062	36.3 <sup>ab</sup> ± 1.915	0.591 <sup>bcde</sup> ± 0.043	6.1 <sup>abc</sup> ± 0.221	0.125 <sup>abc</sup> ± 0.030	31.44 <sup>ab</sup> ± 1.903	17 <sup>abc</sup> ± 1.85

\*Diferente literal en una misma columna indica diferencias significativas (P<0.05), media ± EE, n=12.

Las plantas no transformadas presentaron disminución en la altura de los tallos de 17% para el tratamiento de 200 mM y de 21% para el tratamiento de 400 mM en comparación al testigo, la línea 3A no presentó disminución significativa para los tratamientos de 200 mM y 400 mM de NaCl en comparación al testigo. La línea 3B presentó una disminución de 4% en la altura de tallos solamente en el tratamiento de 400 mM en comparación al testigo, mientras que la línea 3C presentó una disminución de 6% en la altura de tallo para el tratamiento de 400 mM de NaCl en comparación al testigo. En general las plantas testigo de las líneas 3B, 3C y NT presentaron los tallos más altos, mientras que la línea 3A presentó los tallos de menor altura. El efecto del tratamiento de estrés salino en la altura de los tallos fue notorio en todas las plantas para el tratamiento de 400 mM de NaCl pero fue mayor en las plantas no transformadas (Cuadro 5).

En el cuadro 5 se observa una disminución en el peso de la espiga por efecto del tratamiento de estrés salino en las plantas no transformadas con una disminución de 16% para el tratamiento de 200 mM de NaCl y una disminución de 55% de 400 mM de NaCl en comparación al testigo. Las plantas transformadas línea 3A presentaron una disminución significativa de 30% para el tratamiento de 200 mM de NaCl y de 8% para el tratamiento de 400 mM de NaCl. La línea 3B no presentó ninguna disminución en el peso de la espiga por efecto del tratamiento de estrés salino. La línea 3C presentó solamente una disminución de 2% para el tratamiento de 200 mM de NaCl y una disminución de 19% en el peso de la espiga en comparación al testigo (Cuadro 5).

El efecto en el tamaño de la espiga fue poco para las plantas transformadas y no transformadas ya que solamente se presentó una disminución de 6% para el tratamiento de 200 mM de NaCl y de 18% para 400 mM de NaCl para las plantas no transformadas en comparación al testigo. La línea 3A presentó una disminución de 5% en el tamaño de la espiga para el tratamiento de 200 mM de NaCl, mientras que las líneas 3B y 3C presentaron un ligero incremento en comparación a los testigos (Cuadro 5).

El efecto en el tamaño de la espiga fue poco para las plantas transformadas y no transformadas ya que solamente se presentó una disminución de 6% para el tratamiento de 200 mM de NaCl y de 18% para 400 mM de NaCl para las plantas no transformadas en comparación al testigo. La línea 3A presentó una disminución de 5% en el tamaño de la espiga para el tratamiento de 200 mM de NaCl, mientras que las líneas 3B y 3C presentaron un ligero incremento en comparación a los testigos (Cuadro 5).

Por otro lado el efecto en el peso de la raíz por el tratamiento de estrés salino mostró una reducción de 33% para la línea 3A en el tratamiento de 200 mM de NaCl respecto al testigo, y en la línea 3C una disminución de 25% para el tratamiento de 200 mM de NaCl y de 44% para el tratamiento de 400 mM de NaCl, sin embargo la línea 3C presentó el mayor peso de raíz para el tratamiento testigo en comparación a las demás líneas.. Las plantas no transformadas presentaron una disminución significativa de 32% en el tratamiento de 400 mM de NaCl en comparación al testigo. La línea 3B no presentó disminución en el peso de la raíz, el efecto del estrés salino se vio reflejado en un ligero aumento del peso de la raíz en los tratamientos de 200 mM y 400 mM de NaCl (Cuadro 5).

El efecto en el tamaño de la raíz por el tratamiento de estrés salino puede observarse en el cuadro 5 donde todas las plantas presentan reducción en el tamaño de la raíz para los tratamientos de 200 mM y 400 mM de NaCl, esta reducción en el tamaño de la raíz fue más notoria para la concentración de 400 mM de NaCl para las plantas no transformadas con un 32% con respecto a su testigo y de un 30% para la línea 3B en la concentración de 400 mM con respecto a su testigo, mientras que a línea 3C presentó una reducción de 21% en el peso de la raíz para el tratamiento de 400 mM de NaCl con respecto al testigo. La línea 3C presentó las raíces más grandes en comparación a las demás líneas y plantas no transformadas y todas las concentraciones de NaCl (Cuadro 5).

En el cuadro 5 se muestra el efecto del tratamiento de estrés salino en el número de semillas producidas por las plantas transformadas y no transformadas. Se observó una reducción en la cantidad de semillas en las plantas no transformadas de 52% para el tratamiento de 200 mM de NaCl y de un 81% para el tratamiento 400 mM de NaCl con respecto a su testigo. La línea 3A no presentó una reducción significativa en el número de semillas con respecto al testigo en los tratamientos de 200 mM y 400 mM de NaCl. La línea 3B fue la que presentó mayor reducción en la cantidad de semillas que fue de 28% para el tratamiento de 200 mM de NaCl y de 22% para el tratamiento de 400 mM de NaCl. Mientras que la línea 3C presentó una reducción de 11% en la cantidad de semilla solamente para el tratamiento de 400 mM de NaCl. La cantidad de semilla dada por el testigo de la línea 3C fue similar al número de semillas dadas por el testigo de las plantas no transformadas, mientras que los testigos de las líneas 3A y 3B presentaron menor número de semillas en comparación con el testigo de las plantas no transformadas lo que puede ser debido a la transformación de las plantas RD29A (Cuadro 5).

Este es el primer trabajo donde plantas sobre expresando una enzima bifuncional para síntesis de trehalosa son sometidas a elevada salinidad. Tanto plantas de arroz como de *Arabidopsis*, alfalfa y tomate transformadas con una enzima bifuncional para síntesis de trehalosa han sido sometidas a estrés salino ya sea con 100 o 150 mM NaCl. La planta de arroz mostró resistencia a 100 mM de NaCl, además se encontró que las plántulas transformadas mostraban raíces y brotes vigorosos (Garg et al. 2002; Jang et al. 2013). Las plantas de arroz que fueron sometidas a salinidad mostraron raíces más largas que las de las plantas no transformadas (Garg et al. 2002;). En el estudio con plantas de alfalfa sometidas a concentraciones de NaCl de hasta 150 mM, se encontró que el 70% de las plantas mostró ser tolerante a esa concentración de sal (Suarez et al. 2009). En tomate se encontró que una concentración de 150 mM de NaCl causa disminución del 30% en clorofila de plantas no transformadas mientras que las transgénicas no muestran cambios en dicho parámetro (Lyu et al. 2013). Plantas de *arabidopsis* transformadas y sometidas a 350 mM de NaCl

mostraron ser tolerantes a salinidad pero mostraron un significativo retardo en el crecimiento y afectación en la concentración de clorofila (Miranda et al. 2007).

Respecto a biomasa, en alfalfa se reportó que las plantas RD29A::*TPS1-TPS2* presentaron un 62% de incremento en su biomasa en relación a las plantas no transformadas. Por su parte las plantas 35S::*TPS1-TPS2* presentaron un crecimiento lento, su biomasa disminuyó 21% y que algunas líneas fueron estériles o presentaron baja producción de semillas (Suarez et al., 2009).

## RESUMEN DE RESULTADOS

Se obtuvieron plantas de trigo transformadas con el gen *ScTPS1-TPS2* de síntesis de trehalosa mediante la selección de plantas resistentes al herbicida PPT.

Se observaron cambios morfológicos en los tamaños de las raíces de la línea 3A de plantas transformadas, pues fueron significativamente más grandes que las raíces de las plantas no transformadas.

Las plantas transformadas no presentaron diferencias significativas en los tiempos de germinación en comparación con las plantas no transformadas, ya que presentaron tiempos similares.

Durante el tratamiento de estrés salino las plantas transformadas presentaron parámetros de intercambio de gases más altos que las plantas no transformadas en las concentraciones de 200 y 400 mM de NaCl.

Las plantas no transformadas presentaron una disminución de 50% en la eficiencia cuántica del fotosistema II en la concentración de 400 mM de NaCl a los 5 días del tratamiento de estrés salino, mientras que las plantas transformadas se mantuvieron estables durante los 5 días del tratamiento (200 y 400 mM).

Las plantas transformadas presentaron variables de fluorescencia de la clorofila más estables en la concentración de 400 mM de NaCl en comparación a las plantas no transformadas.

Las plantas transformadas no presentaron cambios significativos en la biomasa total en el tratamiento de 200 mM de NaCl, por otro lado se observaron cambios en la biomasa total de las plantas no transformadas pues presentaron una disminución en la biomasa total de un 40% en el tratamiento de 400 mM.

## CONCLUSIONES

La transformación con el gen *ScTPS1-TPS2* para síntesis de trehalosa en trigo está causando cambios tanto a nivel morfológico como fisiológico.

Las plantas de trigo transformadas con el gen *ScTPS1-TPS2* mostraron tolerancia a salinidad, la transformación le permitió a las plantas tener una mayor eficiencia en el uso de agua, en la fijación de CO<sub>2</sub> y en el PSII



## REFERENCIAS

- Adams, R. P., E. Kendall y K. Kartha (1990). Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. *Biochemical systematics and ecology* 18(2): 107-110.
- Adams, W. W. y B. Demming-Adams (2004). Chlorophyll fluorescence as a tool to monitor plant response to the environment. *Chlorophyll a Fluorescence*, Springer: 583-604.
- Aoki, A., A. Kanegami, M. Mihara, T. Kojima, M. Shiraiwa y H. Takahara (2005). Molecular cloning and characterization of a novel soybean gene encoding a leucine-zipper-like protein induced to salt stress. *Gene* 356: 135-145.
- Araus, J., G. Slafer, M. Reynolds y C. Royo (2002). Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for?. *Annals of botany* 89(7): 925-940.
- Ashraf, M. (2010). Inducing drought tolerance in plants: recent advances. *Biotechnology advances* 28(1): 169-183.
- Avonce, N., B. Leyman, J. O. Mascorro-Gallardo, P. Van Dijck, J. M. Thevelein y G. Iturriaga (2004). The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase AtTPS1 gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant physiology* 136(3): 3649-3659.
- Avonce, N., A. Mendoza-Vargas, E. Morett y G. Iturriaga (2006). Insights on the evolution of trehalose biosynthesis. *BMC evolutionary biology* 6(1): 109.
- Azcón-Bieto, J. (1983). Inhibition of photosynthesis by carbohydrates in wheat leaves. *Plant physiology* 73(3): 681-686.
- Baena-González, E., F. Rolland, J. M. Thevelein y J. Sheen (2007). A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. *Nature* 448(7156): 938-942.

- Bhatnagar-Mathur, P., V. Vadez y K. K. Sharma (2008). Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects. *Plant Cell Reports* 27(3): 411-424.
- Blázquez, M. A., E. Santos, C. Flores, J. M. Martínez-Zapater, J. Salinas y C. Gancedo (1998). Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *The Plant Journal* 13(5): 685-689.
- Bray, E. (2002). Abscisic acid regulation of gene expression during water-deficit stress in the era of the *Arabidopsis* genome. *Plant, cell & environment* 25(2): 153-161.
- Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. *Trends in plant science* 2(2): 48-54.
- Calderini, D. F. y G. A. Slafer (1998). Changes in yield and yield stability in wheat during the 20th century. *Field Crops Research* 57(3): 335-347.
- Cassman, K. G., A. Dobermann, D. T. Walters y H. Yang (2003). Meeting cereal demand while protecting natural resources and improving environmental quality. *Annual Review of Environment and Resources* 28(1): 315-358.
- Colaco, C., S. Sen, M. Thangavelu, S. Pinder y B. Roser (1992). Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Nature Biotechnology* 10(9): 1007-1011.
- Colom, M. y C. Vazzana (2003). Photosynthesis and PSII functionality of drought-resistant and drought-sensitive weeping lovegrass plants. *Environmental and Experimental Botany* 49(2): 135-144.
- Conway, G. y G. Toenniessen (1999). Feeding the world in the twenty-first century. *Nature* 402: C55-C58.
- Cortina, C. y F. A. Culiáñez-Macià (2005). Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science* 169(1): 75-82.
- Crowe, J. H., J. F. Carpenter y L. M. Crowe (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual review of physiology* 60(1): 73-103.

- Chaves, M., J. Flexas y C. Pinheiro (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany* 103(4): 551-560.
- Chaves, M. M., J. P. Maroco y J. S. Pereira (2003). Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30(3): 239-264.
- De Virgilio, C., T. Hottiger, J. Dominguez, T. Boller y A. Wiemken (1994). The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. *European Journal of Biochemistry* 219(1-2): 179-186.
- Debast, S., A. Nunes-Nesi, M. R. Hajirezaei, J. Hofmann, U. Sonnewald, A. R. Fernie y F. Börnke (2011). Altering trehalose-6-phosphate content in transgenic potato tubers affects tuber growth and alters responsiveness to hormones during sprouting. *Plant physiology* 156(4): 1754-1771.
- Delatte, T. L., P. Sedijani, Y. Kondou, M. Matsui, G. J. de Jong, G. W. Somsen, A. Wiese-Klinkenberg, L. F. Primavesi, M. J. Paul y H. Schlupepmann (2011). Growth arrest by trehalose-6-phosphate: an astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway. *Plant physiology* 157(1): 160-174.
- Deltoro, V. I., A. Calatayud, C. Gimeno, A. Abadía y E. Barreno (1998). Changes in chlorophyll a fluorescence, photosynthetic CO<sub>2</sub> assimilation and xanthophyll cycle interconversions during dehydration in desiccation-tolerant and intolerant liverworts. *Planta* 207(2): 224-228.
- Demmig-Adams, B. y W. W. Adams (2006). Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytologist* 172(1): 11-21.
- Donnamaria, M. C., E. I. Howard y J. R. Grigera (1994). Interaction of water with  $\alpha$ ,  $\alpha$ -trehalose in solution: molecular dynamics simulation approach. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 90(18): 2731-2735.
- Drennan, P., M. Smith, D. Goldsworthy y J. Van Staden (1993). The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* welw. *Journal of Plant Physiology* 142(4): 493-496.
- Eastmond, P. J., A. J. Van Dijken, M. Spielman, A. Kerr, A. F. Tissier, H. G. Dickinson, J. D. Jones, S. C. Smeekens y I. A. Graham (2002).

Trehalose-6-phosphate synthase 1, which catalyses the first step in trehalose synthesis, is essential for *Arabidopsis* embryo maturation. *The Plant Journal* 29(2): 225-235.

Flexas, J., M. Barón, J. Bota, J.-M. Ducruet, A. Gallé, J. Galmés, M. Jiménez, A. Pou, M. Ribas-Carbó y C. Sajnani (2009). Photosynthesis limitations during water stress acclimation and recovery in the drought-adapted *Vitis* hybrid Richter-110 (*V. berlandieri* vs *V. rupestris*). *Journal of Experimental Botany* 60(8): 2361-2377.

Flexas, J., J. Bota, F. Loreto, G. Cornic y T. Sharkey (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biology* 6(3): 269-279.

Flexas, J. y H. Medrano (2002). Energy dissipation in C3 plants under drought. *Functional Plant Biology* 29(10): 1209-1215.

García-Plazaola, J. I., A. Hernández, J. M. Olano y J. M. Becerril (2003). The operation of the lutein epoxide cycle correlates with energy dissipation. *Functional Plant Biology* 30(3): 319-324.

Garg, A. K., J. K. Kim, T. G. Owens, A. P. Ranwala, Y. D. Choi, L. V. Kochian y R. J. Wu (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99(25): 15898.

Genty, B., J.-M. Briantais y N. R. Baker (1989). The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 990(1): 87-92.

Georgieva, K., L. Maslenkova, V. Peeva, Y. Markovska, D. Stefanov y Z. Tuba (2005). Comparative study on the changes in photosynthetic activity of the homoiochlorophyllous desiccation-tolerant *Haberlea rhodopensis* and desiccation-sensitive spinach leaves during desiccation and rehydration. *Photosynthesis research* 85(2): 191-203.

Goddijn, O. y S. Smeekens (1998). Sensing trehalose biosynthesis in plants. *The Plant Journal* 14(2): 143-146.

Goddijn, O. J. M., T. C. Verwoerd, E. Voogd, R. W. H. H. Krutwagen, P. De Graff, J. Poels, K. van Dun, A. S. Ponstein, B. Damm y J. Pen (1997). Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant physiology* 113(1): 181-190.

- Gómez, L. D., A. Gilday, R. Feil, J. E. Lunn y I. A. Graham (2010). AtTPS1-mediated trehalose 6-phosphate synthesis is essential for embryogenic and vegetative growth and responsiveness to ABA in germinating seeds and stomatal guard cells. *The Plant Journal* 64(1): 1-13.
- Grassi, G. y F. Magnani (2005). Stomatal, mesophyll conductance and biochemical limitations to photosynthesis as affected by drought and leaf ontogeny in ash and oak trees. *Plant, cell & environment* 28(7): 834-849.
- Green, J. y C. Angell (1989). Phase relations and vitrification in saccharide-water solutions and the trehalose anomaly. *The Journal of Physical Chemistry* 93(8): 2880-2882.
- Grieve, C., J. Poss, S. Grattan, D. Suarez, S. Benes y P. Robinson (2004). Evaluation of salt-tolerant forages for sequential water reuse systems: II. Plant-ion relations. *Agricultural water management* 70(2): 121-135.
- Hassan, I. (2006). Effects of water stress and high temperature on gas exchange and chlorophyll fluorescence in *Triticum aestivum* L. *Photosynthetica* 44(2): 312-315.
- Havaux, M. (1992). Stress tolerance of photosystem II in vivo: antagonistic effects of water, heat, and photoinhibition stresses. *Plant physiology* 100(1): 424.
- Holmström, K. O., E. Mäntylä, B. Welin, A. Mandal, E. T. Palva, O. E. Tunnela y J. Londesborough (1996). Drought tolerance in tobacco.
- Hu, Y. y U. Schmidhalter (2005). Drought and salinity: a comparison of their effects on mineral nutrition of plants. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 168(4): 541-549.
- Ingram, J. y D. Bartels (1996). The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual review of plant biology* 47(1): 377-403.
- Iturriaga, G., R. Suárez y B. Nova-Franco (2009). Trehalose metabolism: from osmoprotection to signaling. *International Journal of Molecular Sciences* 10(9): 3793-3810.
- Jang, I. C., S. J. Oh, J. S. Seo, W. B. Choi, S. I. Song, C. H. Kim, Y. S. Kim, H. S. Seo, Y. Do Choi y B. H. Nahm (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 physiology* 131(2): 516-524.

- Lawlor, D. y G. Cornic (2002). Photosynthetic carbon assimilation and associated metabolism in relation to water deficits in higher plants. *Plant, cell & environment* 25(2): 275-294.
- Leyman, B., P. Van Dijck y J. M. Thevelein (2001). An unexpected plethora of trehalose biosynthesis genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends in plant science* 6(11): 510-513.
- Lobell, D. B., M. B. Burke, C. Tebaldi, M. D. Mastrandrea, W. P. Falcon y R. L. Naylor (2008). Prioritizing climate change adaptation needs for food security in 2030. *Science* 319(5863): 607-610.
- Lunn, J. E. (2007). Gene families and evolution of trehalose metabolism in plants. *Functional Plant Biology* 34(6): 550-563.
- Lunn, J. E., R. Feil, J. H. M. Hendriks, Y. Gibon, R. Morcuende, D. Osuna, W. R. Scheible, P. Carillo, M. R. Hajirezaei y M. Stitt (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*. *Biochemical Journal* 397(Pt 1): 139.
- Lyu, J. I., S. R. Min, J. H. Lee, Y. H. Lim, J.-K. Kim, C.-H. Bae y J. R. Liu (2013). Overexpression of a trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase fusion gene enhances tolerance and photosynthesis during drought and salt stress without growth aberrations in tomato. *Plant cell, tissue and organ culture* 112(2): 257-262.
- Martínez-Barajas, E., T. Delatte, H. Schluempmann, G. J. De Jong, G. W. Somsen, C. Nunes, L. F. Primavesi, P. Coello, R. A. Mitchell y M. J. Paul (2011). Wheat grain development is characterized by remarkable trehalose 6-phosphate accumulation pregrain filling: tissue distribution and relationship to SNF1-related protein kinase1 activity. *Plant physiology* 156(1): 373-381.
- Massacci, A., S. Nabiev, L. Pietrosanti, S. Nematov, T. Chernikova, K. Thor y J. Leipner (2008). Response of the photosynthetic apparatus of cotton (*Gossypium hirsutum*) to the onset of drought stress under field conditions studied by gas-exchange analysis and chlorophyll fluorescence imaging. *Plant Physiology and Biochemistry* 46(2): 189-195.

- McDonald, A. y W. Davies (1996). Keeping in touch: responses of the whole plant to deficits in water and nitrogen supply. *Advances in Botanical Research* 22: 229-300.
- Miranda, J. A., N. Avonce, R. Suárez, J. M. Thevelein, P. Van Dijck y G. Iturriaga (2007). A bifunctional TPS–TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 226(6): 1411-1421.
- Miyashita, K., S. Tanakamaru, T. Maitani y K. Kimura (2005). Recovery responses of photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance in kidney bean following drought stress. *Environmental and Experimental Botany* 53(2): 205-214.
- Müller, J., R. A. Aeschbacher, A. Wingler, T. Boller y A. Wiemken (2001). Trehalose and trehalase in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 125(2): 1086-1093.
- Nunes, C., L. F. Primavesi, M. K. Patel, E. Martinez-Barajas, S. J. Powers, R. Sagar, P. S. Fevereiro, B. G. Davis y M. J. Paul (2013). Inhibition of SnRK1 by metabolites: Tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiology and Biochemistry* 63: 89-98.
- Parida, A. K. y A. B. Das (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety* 60(3): 324-349.
- Paul, M. (2007). Trehalose 6-phosphate. *Current opinion in plant biology* 10(3): 303-309.
- Paul, M. J., D. Jhurrea, Y. Zhang, L. F. Primavesi, T. Delatte, H. Schluemann y A. Wingler (2010). Up-regulation of biosynthetic processes associated with growth by trehalose 6-phosphate. *Plant signaling & behavior* 5(4): 386-392.
- Paul, M. J., L. F. Primavesi, D. Jhurrea y Y. Zhang (2008). Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 417-441.
- Pederson, N., J. S. Kush, R. S. Meldahl y W. D. Bayer (1999). Longleaf pine cone crops and climate: a possible link.
- Pellny, T. K., O. Ghannoum, J. P. Conroy, H. Schluemann, S. Smeekens, J. Andralojc, K. P. Krause, O. Goddijn y M. J. Paul (2004). Genetic

modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. *Plant Biotechnology Journal* 2(1): 71-82.

- Perveen, S., M. Shahbaz y M. Ashraf (2011). Modulation in activities of antioxidant enzymes in salt stressed and non-stressed wheat (*Triticum aestivum* L.) plants raised from seed treated with triacontanol. *Pak. J. Bot* 43(5): 2463-2468.
- Pilon-Smits, E. A. H., N. Terry, T. Sears, H. Kim, A. Zayed, S. Hwang, K. van Dun, E. Voogd, T. C. Verwoerd y R. W. H. H. Krutwagen (1998). Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *Journal of Plant Physiology* 152(4): 525-532.
- Pinheiro, C. y M. Chaves (2011). Photosynthesis and drought: can we make metabolic connections from available data?. *Journal of Experimental Botany* 62(3): 869-882.
- Pinkerton, A. y J. Simpson (1986). Interactions of surface drying and subsurface nutrients affecting plant growth on acidic soil profiles from an old pasture. *Animal Production Science* 26(6): 681-689.
- Qayyum, M. A. y M. D. Malik (1988). Farm production losses in salt affected soils.
- Ramanjulu, S. y D. Bartels (2002). Drought-and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, cell & environment* 25(2): 141-151.
- Ramon, M., I. De Smet, L. Vandesteene, M. Naudts, B. Leyman, P. Van Dijck, F. Rolland, T. Beeckman y J. M. Thevelein (2009). Extensive expression regulation and lack of heterologous enzymatic activity of the class II trehalose metabolism proteins from *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell & environment* 32(8): 1015-1032.
- Rijsberman, F. y N. Manning (2006). Prioridades hídricas, alimentación y medio ambiente. *Vanguardia dossier*(21): 67-76.
- Romero, C., J. M. Bellés, J. L. Vayá, R. Serrano y F. A. Culiáñez-Macià (1997). Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta* 201(3): 293-297.
- Schluepmann, H., A. Van Dijken, M. Aghdasi, B. Wobbes, M. Paul y S. Smeekens (2004). Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis*



seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant physiology* 135(2): 879-890.

- Shahbaz, M. y M. Ashraf (2008). Does exogenous application of 24-epibrassinolide ameliorate salt induced growth inhibition in wheat (*Triticum aestivum* L.)?. *Plant Growth Regulation* 55(1): 51-64.
- Shahbaz, M., M. Ashraf, N. A. Akram, A. Hanif, S. Hameed, S. Joham y R. Rehman (2011). Salt-induced modulation in growth, photosynthetic capacity, proline content and ion accumulation in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Acta Physiologiae Plantarum* 33(4): 1113-1122.
- Shangguan, Z., M. Shao y J. Dyckmans (1999). Interaction of osmotic adjustment and photosynthesis in winter wheat under soil drought. *Journal of Plant Physiology* 154(5): 753-758.
- Skotnica, J., M. Matoušková, J. Nauš, D. Lazár y L. Dvořák (2000). Thermoluminescence and fluorescence study of changes in Photosystem II photochemistry in desiccating barley leaves. *Photosynthesis research* 65(1): 29-40.
- Slafer, G. (2003). Genetic basis of yield as viewed from a crop physiologist's perspective. *Annals of Applied Biology* 142(2): 117-128.
- Sofo, A., B. Dichio, C. Xiloyannis y A. Masia (2004). Effects of different irradiance levels on some antioxidant enzymes and on malondialdehyde content during rewatering in olive tree. *Plant Science* 166(2): 293-302.
- Sperdoui, I. y M. Moustakas (2012). Interaction of proline, sugars, and anthocyanins during photosynthetic acclimation of *Arabidopsis thaliana* to drought stress. *Journal of Plant Physiology* 169(6): 577-585.
- Strom, A. y I. Kaasen (1993). Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Molecular microbiology* 8(2): 205-210.
- Suárez, R., C. Calderón y G. Iturriaga (2009). Enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic alfalfa accumulating trehalose. *Crop science* 49(5): 1791-1799.
- Susan, S. (2007). Climate change 2007-the physical science basis: Working group I contribution to the fourth assessment report of the IPCC, Cambridge University Press.

- Thevelein, J. (1996). Regulation of trehalose metabolism and its relevance to cell growth and function. *The mycota* 3: 395-414.
- Triantaphylidès, C. y M. Havaux (2009). Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in plant science* 14(4): 219-228.
- Van Dijken, A. J., H. Schluempmann y S. C. Smeekens (2004). *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant physiology* 135(2): 969-977.
- Vogel, G., R. A. Aeschbacher, J. Müller, T. Boller y A. Wiemken (1998). Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana*: identification by functional complementation of the yeast tps2 mutant. *The Plant Journal* 13(5): 673-683.
- Wang, W., B. Vinocur y A. Altman (2003). Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* 218(1): 1-14.
- Watanabe, M., T. Kikawada, N. Minagawa, F. Yukuhiro y T. Okuda (2002). Mechanism allowing an insect to survive complete dehydration and extreme temperatures. *Journal of experimental biology* 205(18): 2799-2802.
- Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of experimental biology* 208(15): 2819-2830.
- Yancey, P. H., M. E. Clark, S. C. Hand, R. D. Bowlus y G. N. Somero (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* 217(4566): 1214-1222.
- Yeo, E. T., H. B. Kwon, S. E. Han, J. T. Lee, J. C. Ryu y M. Byu (2000). Genetic engineering of drought resistant potato plants by introduction of the trehalose-6-phosphate synthase (TPS1) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecules and cells* 10(3): 263.
- Yordanov, I., V. Velikova y T. Tsonev (2000). Plant responses to drought, acclimation, and stress tolerance. *Photosynthetica* 38(2): 171-186.
- Zentella, R., J. O. Mascorro-Gallardo, P. Van Dijck, J. Folch-Mallol, B. Bonini, C. Van Vaeck, R. Gaxiola, A. A. Covarrubias, J. Nieto-Sotelo y J. M. Thevelein (1999). A *Selaginella lepidophylla* Trehalose-6-Phosphate

Synthase Complements Growth and Stress-Tolerance Defects in a Yeast *tps1* Mutant. *Plant physiology* 119(4): 1473-1482.

Zhang, Y., L. F. Primavesi, D. Jhurrea, P. J. Andralojc, R. A. Mitchell, S. J. Powers, H. Schluemann, T. Delatte, A. Wingler y M. J. Paul (2009). Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant physiology* 149(4): 1860-1871.