



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

**CAMBIOS EN EL CICLO DE CALVIN POR LA
TRANSFORMACIÓN CON EL GEN *ScTPS1-TPS2* EN
PLANTAS DE TRIGO BAJO SEQUÍA**

Por:

Andrea Romero Reyes

TESIS APROBADA POR LA

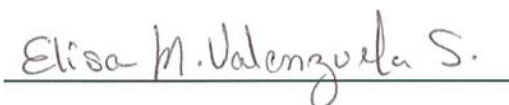
COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Andrea Romero Reyes la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto
Directora de Tesis



M.C. Ciria Guadalupe Figueroa Soto
Asesora



Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez
Asesor

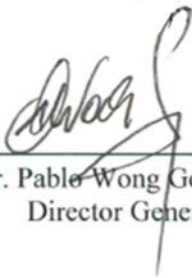


Dra. Marisela Rivera Domínguez
Asesora

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 esta 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 requiere la autorización escrita, del manuscrito en cuestión, del director o directora de tesis. En estos casos siempre se deberá dar los créditos al CIAD.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico recibido durante mis estudios de Maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., por la oportunidad de continuar con mi formación académica y de realizar mi trabajo de investigación en sus instalaciones.

Al proyecto CV181574 por el financiamiento de los recursos necesarios para el desarrollo del trabajo experimental de tesis.

Gracias al Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora, a los maestros M.A. Rafael Retes López y M.C. David René Fernández, por permitirnos utilizar sus instalaciones y a Antonio, por toda la ayuda técnica y las atenciones brindadas.

Al M.C. Jesús Antonio Orozco Avitia y M.C. Aldo Hiram Gutiérrez Saldaña de la Coordinación de Tecnología de Alimentos de Origen Vegetal, por el apoyo con las determinaciones durante los días de muestreo del trabajo experimental.

Gracias al Q.B. Francisco Soto, del Laboratorio de Fisiología Vegetal, por el apoyo con el equipo de cromatografía y el análisis de las muestras, además de atender mis dudas de manera tan atenta.

A los miembros del comité, el Dr. Miguel Ángel Martínez y la Dra. Marisela Rivera, por toda su retroalimentación y aportes al trabajo de tesis a lo largo de los seminarios y por su disposición para trabajar en conjunto.

Gracias al Laboratorio de Bioquímica de Proteínas de Estrés. A la Dra. Elisa Valenzuela, por permitir seguir desarrollándome en el área de investigación en su grupo de trabajo. A la M.C. Ciria Figueroa, por todas las enseñanzas técnicas y académicas.

A mis compañeros de laboratorio, por compartir su experiencia y conocimientos conmigo, así como los momentos buenos y no tan buenos, durante estos años de trabajo. Gracias también a los compañeros de generación que se convirtieron en buenos amigos.

DEDICATORIA

A mis papás por siempre apoyarme en mis decisiones y motivarme a seguir preparándome.

A mis hermanos, por su comprensión durante estos años de estudio.

A mi abuelo, por enseñarme que la educación es la mejor inversión y el arma más poderosa.

A mis amigos por su paciencia y palabras de motivación en todos los momentos en los que lo necesité.

CONTENIDO

APROBACIÓN.....	2
DECLARACIÓN INSTITUCIONAL.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
DEDICATORIA.....	5
CONTENIDO.....	6
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE TABLAS.....	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. LAS PLANTAS Y EL ESTRÉS HÍDRICO.....	14
2.1 Estrés por Sequía en Agricultura.....	14
2.2 Ajuste Osmótico como Respuesta al Estrés.....	15
2.3 El Trigo y los Problemas en su Cultivo.....	16
3. LA TREHALOSA Y SU FUNCIÓN.....	18
3.1 Abundancia en la Naturaleza.....	18
3.2 Vías de Síntesis de Trehalosa.....	19
3.3 Mejoramiento Genético de Cultivos para Responder al Estrés.....	21
4. FOTOSÍNTESIS.....	23
4.1 Fase Luminosa.....	23
4.2 Ciclo de Calvin.....	24
4.2.1 Rubisco.....	25
4.2.2 Regulación del Ciclo de Calvin.....	27
4.3 Efectos de la Sequía sobre la Fotosíntesis.....	28
4.4 Síntesis de Trehalosa y Fotosíntesis Bajo Condiciones de Estrés.....	30
5. HIPÓTESIS.....	32
6. OBJETIVOS.....	33
6.1 Objetivo General.....	33
6.2 Objetivos Específicos.....	33
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
7.1 Material Biológico.....	34
7.2 Obtención de Plantas.....	34
7.3 Tratamiento de Sequía.....	35
7.4 Cuantificación del Contenido Relativo de Agua.....	35
7.5 Medición de Parámetros Fotosintéticos y Curvas de CO ₂	35

CONTENIDO (Continuación)

7.6 Cuantificación de Clorofilas y Carotenoides.....	36
7.7 Cuantificación de Carbohidratos.....	37
7.8 Obtención de Extractos Enzimáticos.....	37
7.9 Ensayo de Actividad de Rubisco.....	38
7.10 Ensayo de Actividad de Fructosa-1,6-bifosfatasa.....	38
7.11 Ensayo de Actividad de Sacarosa Fosfato Sintasa.....	39
7.12 Cuantificación de Proteína.....	39
7.13 Análisis Estadístico.....	39
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
8.1 Germinación y Desarrollo de las Plantas de Trigo.....	41
8.2 Contenido Relativo de Agua de las Plantas de Trigo durante el Tratamiento de Sequía.....	42
8.3 Fotosíntesis Luminosa en las Plantas de Trigo durante el Tratamiento de Sequía.....	44
8.3.1 Contenido de Clorofila y Carotenoides.....	45
8.3.2 Actividad del Transporte de Electrones.....	47
8.4 Intercambio Gaseoso de las Plantas de Trigo Durante el Tratamiento de Sequía.....	50
8.4.1 Tasa Fotosintética (A)	50
8.4.2 Concentración intercelular de CO ₂ (Ci).....	52
8.4.3 Tasa de Transpiración (E).....	54
8.5 Ciclo de Calvin en las Plantas de Trigo durante Sequía.....	55
8.5.1 Actividad de Rubisco.....	58
8.5.2 Actividad de Fructosa 1,6-bifosfatasa.....	55
8.5.3 Actividad de Sacarosa Fosfato Sintasa.....	61
8.6 Contenido de Azúcares en las Plantas de Trigo durante Sequía.....	63
8.6.1 Contenido de Sacarosa.....	63
8.6.2 Contenido de Trehalosa.....	65
8.7 Recuperación de las Plantas de Trigo al Estrés por Sequía.....	67
9. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS.....	71
10. CONCLUSIÓN.....	75
11. PERSPECTIVAS.....	76
12. REFERENCIAS.....	84
ANEXOS.....	80

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Rutas de síntesis de trehalosa	20
2	Ciclo de Calvin y síntesis de azúcares en la célula vegetal.....	25
3	Contenido de pigmentos fotosintéticos en las líneas de plantas de trigo durante el tratamiento de sequía	46
4	Curvas de CO ₂ de las líneas de plantas de trigo sin estrés y a los ocho días del tratamiento de sequía.....	48
5	Tasa fotosintética de las líneas de plantas de trigo durante el tratamiento de sequía	51
6	Concentración intercelular de CO ₂ en las líneas de plantas de trigo durante el tratamiento de sequía	53
7	Tasa de transpiración de las líneas de plantas de trigo durante el tratamiento de sequía	55
8	Actividad de Rubisco en las líneas de plantas de trigo durante el tratamiento de estrés por sequía	58
9	Actividad de fructosa 1,6-bifosfatasa en las líneas de plantas de trigo durante el tratamiento de estrés por sequía	60
10	Actividad de sacarosa fosfato sintasa en las líneas de plantas de trigo durante el tratamiento de estrés por sequía	62
11	Contenido de azúcares en las líneas de plantas de trigo durante el tratamiento de estrés por sequía	66
12	Cambios en el ciclo de Calvin en las plantas de trigo transformadas con el promotor de expresión constitutiva (35S).....	73
13	Cambios en el ciclo de Calvin en las plantas de trigo transformadas con el promotor de respuesta a estrés (rd29A).....	74

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Estudios de la transformación de plantas para aumentar su capacidad de síntesis de trehalosa	22
2	Porcentajes de germinación total de las líneas de semillas de trigo....	41
3	Contenido relativo de agua (CRA) de las plantas de trigo durante el tratamiento de sequía	43
4	Actividad del transporte de electrones de las plantas de trigo antes y después del tratamiento de sequía	49
5	Tiempo y porcentajes de formación de espigas e inflorescencias de las líneas de plantas de trigo	68

RESUMEN

El ciclo de Calvin es la fase de la fotosíntesis mediante la cual las plantas producen carbohidratos a partir de la fijación de dióxido de carbono (CO₂) por la enzima Rubisco. El agua es un sustrato fundamental para la fotosíntesis, por lo que la sequía es uno de los tipos de estrés abiótico que más afecta el desarrollo de las plantas. Existe un grupo especial de plantas llamado “plantas de resurrección”, caracterizadas por sobrevivir a la desecación acumulando trehalosa, un azúcar no reductor. Se ha demostrado que la modificación genética para aumentar la síntesis de trehalosa en diversos cultivos, mejora su tolerancia al estrés abiótico y que, además, mejora la fotosíntesis en condiciones de sequía; sin embargo, se desconoce el impacto que tiene en el ciclo de Calvin. El objetivo de este trabajo fue analizar el efecto de la transformación con el gen *ScTPS1-TPS2*, el cual codifica para una enzima bifuncional para síntesis de trehalosa, sobre el ciclo de Calvin en plantas de trigo bajo sequía. Se sembraron plantas transformadas con el gen *ScTPS1-TPS2*, una dirigida por el promotor de expresión constitutiva CaMV35S (35S) y dos líneas por el promotor de respuesta a estrés rd29A (RD1B y RD1C) y plantas de trigo no transformadas (NT). Las plantas se sometieron a un tratamiento de ocho días de sequía y se determinaron sus parámetros fotosintéticos, actividad de Rubisco, fructosa 1,6-bisfosfatasa y sacarosa fosfato sintasa y se cuantificó el contenido de azúcares. Las plantas transformadas mantuvieron la actividad de Rubisco dos veces más alta ($P \leq 0.05$) al final del tratamiento respecto a las NT. Las líneas RD1B y RD1C tuvieron una tasa fotosintética más alta ($P \leq 0.05$) durante el tratamiento y no mostraron cambios ($P \geq 0.05$) en su intercambio gaseoso, mientras que en la línea 35S la fotosíntesis disminuyó ($P \leq 0.05$) debido a una menor asimilación de CO₂ al igual que en las NT. La línea 35S tuvo una mayor concentración de trehalosa, pero menos sacarosa y almidón que las otras líneas, lo cual afectó su crecimiento y disminuyó la continuación del ciclo de Calvin. Las líneas RD1B y RD1C mantuvieron el ciclo de Calvin y la síntesis de almidón y, aun cuando aumentaron la trehalosa durante la sequía, su crecimiento no se vio afectado. Se concluye que la transformación con el gen *ScTPS1-TPS2* mejora la fotosíntesis y produce cambios en el flujo de carbono fijado por la Rubisco, lo cual impacta sobre el ciclo de Calvin.

Palabras clave: fotosíntesis, ciclo de Calvin, trehalosa, sequía, trigo.

ABSTRACT

The Calvin cycle is the phase of the photosynthetic process in which the enzyme Rubisco fixes carbon dioxide (CO₂) for carbohydrate synthesis, such as sucrose and starch. Water is a fundamental substrate for photosynthesis, making drought one of the most damaging types of abiotic stress for plants. Resurrection plants, a unique group of organisms, can survive desiccation conditions by accumulating trehalose, a non-reducing sugar. It has been demonstrated that increasing trehalose synthesis in crops by genetic modification enhances their abiotic stress tolerance and improves their photosynthetic performance, even during drought. However, how the Calvin cycle is modified by this transformation remains unknown. The aim of this work was to analyze the effect of the transformation with the *ScTPS1-TPS2* gene, for the overexpression of a bifunctional TPS-TPP enzyme for trehalose synthesis, in the Calvin cycle of wheat plants during drought stress. Non-transformed (NT) and three different transformed wheat plants lines were grown. In one line, transformation with the *ScTPS1-TPS2* gene was driven by the constitutive expression CaMV35S promoter (35S) and by the stress-response promoter rd29A in the other two lines (RD1B y RD1C). Wheat plants received an eight-day drought treatment and photosynthetic parameters, enzymatic activity of Rubisco, fructose 1-6-biphosphatase and sucrose phosphate synthase, as well as sugar content were measured. Transformed lines-maintained Rubisco activity two folds higher ($P \leq 0.05$) than NT plants at the end of the drought treatment. RD1B and RD1C lines also had a higher ($P \leq 0.05$) photosynthetic rate during drought and their gas interchange was not affected ($P \geq 0.05$), whereas in 35S line, as well as in NT plants, photosynthetic rate decreased ($P \leq 0.05$) because of a lower CO₂ assimilation. Trehalose content was higher ($P \leq 0.05$) in 35S line, but it had less sucrose and starch in comparison with the other plants, affecting Calvin cycle and plant growth. RD1B and RD1C plants-maintained Calvin cycle activity and starch synthesis and increased their trehalose ($P \leq 0.05$) content during drought, but growth was not affected. It is concluded that transformation with the *ScTPS1-TPS2* gene of wheat plants improves photosynthesis and modifies Calvin cycle by changes in carbon flux.

Key words: photosynthesis, Calvin cycle, trehalose, drought, wheat.

1. INTRODUCCIÓN

La fotosíntesis es un proceso fundamental para la Tierra, pues a partir de este se generan el oxígeno y la materia orgánica necesarios para la vida de muchos organismos que habitan el planeta. A partir de luz solar, agua y dióxido de carbono (CO_2), las plantas, así como algunas bacterias y algas fotosintéticas, sintetizan los carbohidratos que representan la fuente de alimentación de muchas especies de animales; por ello, la fotosíntesis se considera como la base de las cadenas tróficas (Taiz y Zeiger, 2010).

La síntesis de carbohidratos a partir de materia inorgánica es posible por la acción de la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa, mejor conocida como Rubisco. Esta enzima es la proteína más abundante en el planeta y participa en la fijación del CO_2 atmosférico, que utiliza como sustrato para producir moléculas carbonadas durante el ciclo de Calvin (Taiz y Zeiger, 2010).

En las plantas, el crecimiento y producción dependen directamente de la fotosíntesis, por lo que la eficiencia de este proceso influye en la acumulación de biomasa (Parry et al., 2011). En agricultura, una de las mayores problemáticas es la falta de suministro de agua. Debido a que el agua es uno de los sustratos necesarios para la fotosíntesis, las plantas que crecen en ambientes con baja disponibilidad de agua ven afectado su rendimiento (Basurto et al., 2008; Marquez Berber et al., 2014). Además, se espera que el cambio climático aumente la persistencia de las sequías severas en diversas regiones del mundo (IPCC, 2013).

No obstante, las plantas cuentan con diversos mecanismos de respuesta a la sequía. Uno de los más estudiados es el ajuste osmótico, que consiste en la síntesis y acumulación de moléculas que evitan la salida del agua de la célula (Taiz y Zeiger, 2010). Algunas especies de plantas pueden sintetizar moléculas que, además de prevenir la pérdida de agua, mantienen la estructura celular y protegen a las membranas y proteínas; estas moléculas son conocidas como “compuestos compatibles” u “osmolitos” (Taiz y Zeiger, 2010; Anjum et al., 2011).

Uno de los osmolitos más estudiados es la trehalosa, un disacárido no reductor con la característica de ser resistente a temperaturas y pH extremos (Paul et al., 2008). En el reino

vegetal, existe un grupo particular de plantas con la capacidad de acumular trehalosa, llamadas “plantas de resurrección”. La acumulación de este osmolito les permite sobrevivir en condiciones de desecación y de recuperar su metabolismo cuando reciben agua nuevamente (Dinakar et al., 2012). Por otra parte, también se ha descrito que microorganismos como *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, deben su capacidad de sobrevivir a la deshidratación y a temperaturas extremas a la acumulación de trehalosa (Singer y Lindquist, 1998).

A partir del conocimiento sobre el papel que juega la trehalosa en la protección celular, diversas investigaciones se han centrado en la inserción de genes de origen microbiano en algunas especies de plantas, para aumentar su capacidad de sintetizar trehalosa (Jang et al., 2003; Lee et al., 2003; Lyu et al., 2012; Pellny et al., 2004; Cortina y Culiáñez-Macià, 2005), esto con la finalidad de mejorar su tolerancia a condiciones adversas, como la sequía. Como resultado, se ha encontrado que una mayor síntesis de trehalosa no solo mejora la tolerancia de las plantas a los ambientes desfavorables, sino que también permite el mantenimiento de la fotosíntesis, aun durante la falta de agua (Jang et al., 2003; Lee et al., 2003; Lyu et al., 2012; Pellny et al., 2004; Cortina y Culiáñez-Macià, 2005). Sin embargo, son pocos los trabajos que se han dedicado a estudiar específicamente la relación que existe entre una mayor síntesis de trehalosa y una mejor síntesis de carbohidratos a través del ciclo de Calvin.

Resulta relevante entonces continuar profundizando en estudios sobre el efecto de la transformación genética de plantas sobre cambios en su metabolismo, ya que esto contribuirá al desarrollo de especies vegetales más tolerantes a la sequía y otras condiciones climáticas adversas. En el presente trabajo se evaluó el efecto de la transformación de plantas de trigo con un gen para aumentar su capacidad de síntesis de trehalosa en la eficiencia de su fotosíntesis y del ciclo de Calvin.

2. LAS PLANTAS Y EL ESTRÉS HÍDRICO

Las plantas son organismos autótrofos, pues producen su propio alimento utilizando sustancias inorgánicas en el proceso conocido como fotosíntesis. En la célula vegetal, el agua constituye de 80 a 95% del volumen total; además, es un nutriente esencial, ya que el agua es uno de los sustratos requeridos para que la fotosíntesis pueda llevarse a cabo (Taiz y Zeiger, 2010).

Desde el punto de vista biológico, el estrés es aquel “conjunto de respuestas bioquímicas y fisiológicas que definen un estado particular de un organismo, diferente al observado en condiciones óptimas” (Basurto et al., 2008). Cuando el estrés es causado por factores ambientales, como la salinidad y pH del suelo, radiación, temperatura o disponibilidad de agua, se le conoce como estrés abiótico. Específicamente, el estrés hídrico ocurre cuando el consumo de agua excede al suministro de esta, y es provocado por los factores abióticos que comprometen la disponibilidad de agua, como la salinidad, el congelamiento o la sequía. Todos estos tipos de estrés, ya sea por separado o en conjunto, afectan el crecimiento, desarrollo y productividad de los cultivos (Zingaretti et al., 2013).

2.1 Estrés por Sequía en Agricultura

La sequía es la principal limitante en el rendimiento de los cultivos agrícolas, ya que la falta de agua afecta los procesos metabólicos de las plantas, principalmente la fotosíntesis (Zingaretti et al., 2013). Gran parte de las especies vegetales utilizadas en agricultura frecuentemente crecen en ambientes donde el agua es limitada, por ejemplo, en México se estima que el 41% de la superficie agrícola se encuentra en zonas áridas y semiáridas (Basurto et al., 2008).

El déficit de agua compromete el crecimiento y desarrollo de los cultivos; además, afecta su rendimiento y productividad (Taiz y Zeiger, 2010; Chakraborty y Pradhan, 2012). La agricultura es una actividad económica que requiere de un gran consumo de agua potable,

lo que ha aumentado la demanda en su suministro. Además, se espera que el cambio climático agrave la severidad de las sequías actuales a lo largo del planeta (IPCC, 2013; Zingaretti et al., 2013), por lo cual el desarrollo de especies vegetales con una mayor tolerancia a condiciones ambientales adversas podría contribuir a mejorar la producción agrícola frente al cambio climático.

2.2 Ajuste Osmótico como Respuesta al Estrés

El ajuste osmótico es un mecanismo con el cual algunas plantas responden al estrés hídrico. Para evitar la pérdida de agua en ambientes de sequía, las plantas sintetizan y acumulan diferentes solutos, disminuyendo así el potencial hídrico de la célula (Taiz y Zeiger, 2010).

Los solutos que participan en el ajuste osmótico pueden ser moléculas como azúcares, azúcares alcoholes, ácidos orgánicos, aminoácidos y algunos iones inorgánicos; sin embargo, iones como el Na^+ pueden inhibir la actividad de algunas enzimas. Los solutos que no interfieren con las funciones enzimáticas de la célula se llaman “solutos compatibles” u “osmolitos”. Dentro de este tipo de moléculas se encuentran la prolina, el manitol, el sorbitol, la glicina betaína y la trehalosa (Taiz y Zeiger, 2010).

El papel de los osmolitos en la protección de las plantas frente al estrés ha sido comprobado en varios trabajos. Al modificar genéticamente diferentes especies de plantas para aumentar su capacidad de sintetizar osmolitos como manitol, prolina y glicina betaína, se obtuvieron plantas más resistentes a la sequía, salinidad, frío y estrés oxidativo (Moghiaeb et al., 2000; Abebe et al., 2003; De Ronde et al., 2004; Kumar et al., 2004). También, Sivakumar y colaboradores (2002) encontraron que al aumentar la concentración de manitol, trehalosa y otros azúcares alcoholes, la fijación de carbono en la fotosíntesis se mantuvo durante estrés salino en plantas de *Sesbania sesban*. Por su parte, se sabe que un aumento en la acumulación de prolina está relacionado con una mejor tolerancia al estrés en plantas de trigo (Habash et al., 2014; Mishra et al., 2017).

2.3 El Trigo y los Problemas en su Cultivo

El trigo es uno de los cereales más consumidos a nivel mundial y ha representado la base de la alimentación en muchas culturas desde tiempos antiguos. Dentro del género *Triticum*, las especies *T. aestivum* (panadero) y *T. durum* (cristalino) son las más utilizadas para alimentación. En México, según la funcionalidad de su grano, el trigo se clasifica como fuerte, medio fuerte, suave o cristalino; estos últimos son utilizados para producir pastas y sémolas, mientras que los primeros se emplean en la industria de panificación (Juárez et al., 2014).

Las plantas de trigo tienen una temperatura óptima de crecimiento de 10 a 25 °C, mientras que la humedad del suelo no debe ser menor al 30%. Su ciclo de vida consiste en una serie de cinco etapas de desarrollo: emergencia, macollaje, encañado, formación de la espiga y llenado del grano. Una vez formado el grano, sigue una etapa de secado, donde las semillas formadas pierden humedad (Miralles et al., 2014).

Por su tipo de fotosíntesis, el trigo se clasifica como una planta C3. La hoja donde se forma la espiga, llamada “hoja bandera”, es fundamental para su rendimiento, ya que realiza una fotosíntesis más eficiente que el resto de las hojas y aporta de 30 a 50% de los carbohidratos utilizados para producir grano (Medrano et al., 2012; Flexas et al., 2016; Dwivedi et al., 2017).

La producción mundial de trigo ha sido afectada por problemas ambientales como sequías, heladas o excesos de lluvia (Marquez Berber et al., 2014). La disponibilidad de agua representa una limitante para su producción, tanto bajo condiciones de temporal, como por irrigación. Los cultivos realizados bajo irrigación tienen un rendimiento casi tres veces mayor a los que dependen de las precipitaciones; sin embargo, el agua es uno de los insumos más caros para los productores (Marquez Berber et al., 2014).

Lo anterior ha provocado que la mayoría de los productores mexicanos prefieran sembrar trigo cristalino, pues es más tolerante a las condiciones climáticas desfavorables comparado con el panadero. No obstante, el trigo cristalino no se consume tanto como el panadero, por lo que los agricultores mexicanos se han visto en la necesidad de exportar su producción e importar trigo para panificación. Por ello, la introducción de nuevas

variedades de trigo panadero más tolerantes a los ambientes extremos es una necesidad para mejorar la producción agrícola (Marquez Berber et al., 2014).

3. LA TREHALOSA Y SU FUNCIÓN

La trehalosa (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido) es un disacárido formado por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace glucosídico α - α -1-1. Este enlace le confiere ciertas características particulares a la molécula: además de ser no reductor, es estable a temperaturas de hasta 100 °C y a un rango de pH de 3.5 hasta 10 (Paul et al., 2008).

La molécula de trehalosa es altamente hidroxilada, por lo que tiene la capacidad de formar puentes de hidrógeno con las proteínas y membranas celulares, manteniendo su estructura y función. Se propone que la trehalosa interactúa con la capa de hidratación de las proteínas cuando la célula se encuentra en condiciones de desecación (Pereira et al., 2004; Jain y Roy, 2009).

3.1 Abundancia en la Naturaleza

La trehalosa es sintetizada por todos los organismos, excepto por los vertebrados (Paul et al., 2008). En el reino vegetal, este disacárido se encuentra ampliamente distribuido. Existe un grupo especial de plantas con la capacidad de acumular esta molécula, llamado “plantas de resurrección” (Valenzuela-Avendaño y Valenzuela-Soto, 2009; Dinakar et al., 2012).

Las plantas de resurrección reciben ese nombre porque pueden sobrevivir en condiciones de deshidratación casi completa y recuperar su estado funcional al rehidratarse. Generalmente, estas plantas crecen en ambientes donde hay poca disponibilidad de agua. Algunos ejemplos de este tipo de plantas son *Craterostigma plantagineum*, *Myrothamus flabellifolia*, *Eragrostis nindensis*, *Xerophyta viscosa* y las plantas del género *Selaginella*, entre otras (Dinakar et al., 2012).

La tolerancia de estas plantas a la falta de agua se debe a los diversos mecanismos con los cuales protege la integridad celular y repara el daño provocado por los procesos de deshidratación y rehidratación. Uno de ellos es el apagamiento de su fotosíntesis durante

la desecación como estrategia para minimizar la generación de especies reactivas del oxígeno. Además, cuentan con un sistema de enzimas y moléculas con actividad antioxidante (Kranner y Birti, 2005; Dinakar et al., 2012).

El mecanismo bioquímico más importante en estas plantas, sin embargo, es su capacidad de sintetizar y acumular azúcares no reductores, como sacarosa, rafinosa y, principalmente, trehalosa; este último sobre todo en las plantas del género *Selaginella* (Valenzuela-Avendaño y Valenzuela-Soto, 2009). En otras especies, se ha reportado la acumulación de sacarosa como producto de la fotosíntesis, relacionada con la actividad de las enzimas sacarosa fosfato sintasa (SPS) y sacarosa sintasa (SS) (Ingram et al., 1997; Ramanjulu y Bartels, 2002; Dinakar et al., 2012).

La trehalosa también ha sido muy estudiada en microorganismos, principalmente en levaduras. En *Saccharomyces cerevisiae*, la presencia de trehalosa se relaciona con su supervivencia a altas temperaturas y a la deshidratación, así como a la reactivación de su metabolismo después de rehidratarse (Singer y Lindquist, 1998). Se propone que la trehalosa previene la desnaturalización de las proteínas como una alternativa cuando la protección por proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*) no es suficiente (Singer y Lindquist, 1998).

3.2 Vías de Síntesis de Trehalosa

Actualmente se conocen cinco diferentes rutas por las cuales se lleva a cabo la síntesis de trehalosa (Fig. 1). De estas, la más distribuida en la naturaleza es la vía trehalosa fosfato sintasa-trehalosa fosfato fosfatasa (vía TPS-TPP) (Fig. 1e) (Paul et al., 2008; Valenzuela-Avendaño y Valenzuela-Soto, 2009).

En la vía TPS-TPP, la trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) cataliza la síntesis de trehalosa-6-fosfato (T6P), transfiriendo una molécula de glucosa a partir de UDP-glucosa, a una molécula de glucosa-6-fosfato (G6P); después, la trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP) defosforila a la molécula de T6P para generar trehalosa y fosfato inorgánico (Paul et al.,

2008). Esta ruta ocurre en todos los organismos procariontes y eucariontes que sintetizan trehalosa; además, esta es la única vía reportada en plantas (Paul et al., 2008).

En cuanto a microorganismos, en *S. cerevisiae*, se descubrió que la síntesis de trehalosa está catalizada por dos enzimas homólogas a la TPS y TPP: la TPS1, con función de sintasa y la TPS2, que actúa como fosfatasa. Ambas forman un complejo enzimático en conjunto con dos subunidades reguladoras, la TPS3 y la cadena larga de trehalosa sintasa (TSL). En cambio, en *Escherichia coli*, la TPS y la TPP son dos entidades separadas (Bell et al., 1998; Paul et al., 2008).

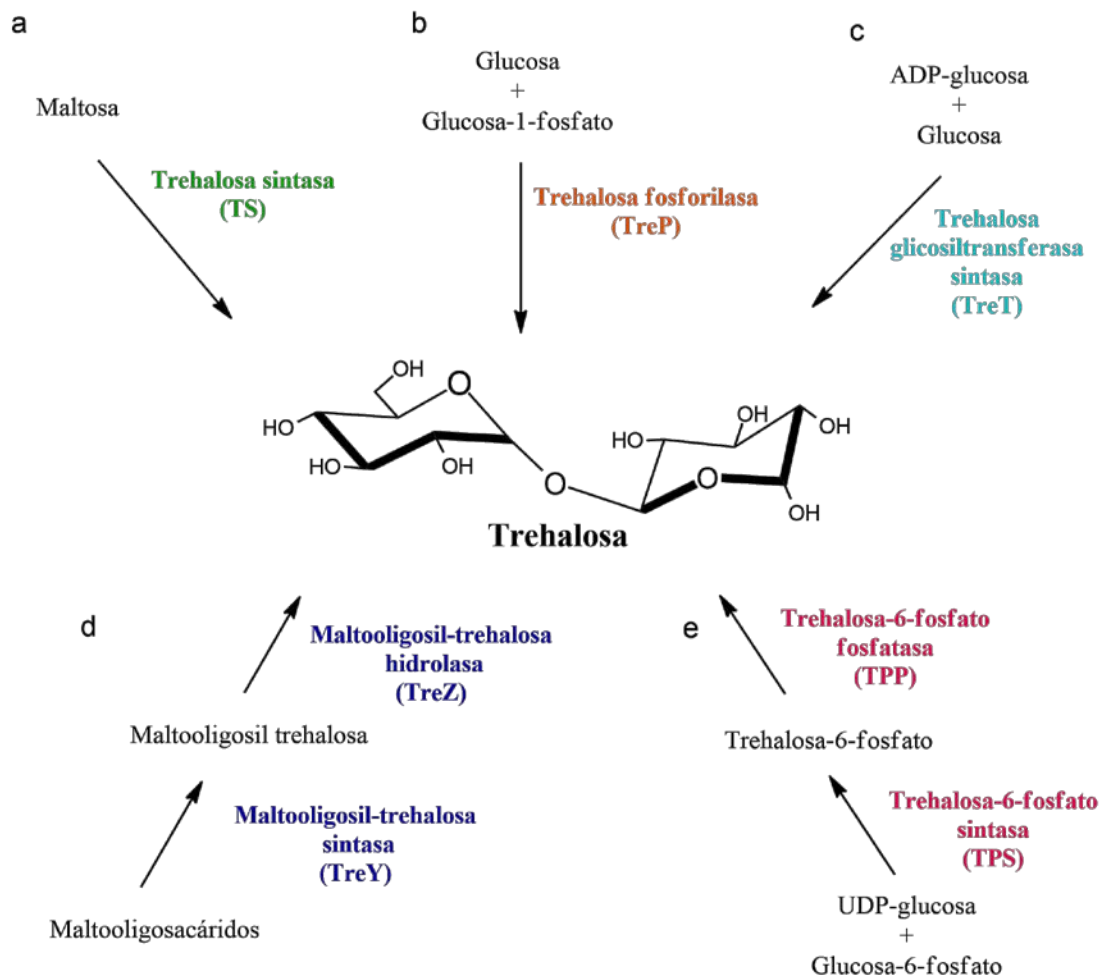


Figura 1. Rutas de síntesis de trehalosa. Vías de síntesis de trehalosa distribuidas en la naturaleza. a) Síntesis de trehalosa a partir de maltosa; b) síntesis de trehalosa a partir de glucosa y glucosa-1-fosfato; c) síntesis de trehalosa a partir de glucosa y ADP-glucosa; d) síntesis de trehalosa a partir de maltooligosacáridos; e) síntesis de trehalosa a partir de

UDP-glucosa y glucosa-6-fosfato (Paul et al., 2008; Valenzuela-Avendaño y Valenzuela-Soto, 2009).

3.3 Mejoramiento Genético de Cultivos para Responder al Estrés

El conocimiento de los mecanismos de respuesta al estrés de las plantas ha permitido el desarrollo de variedades vegetales más tolerantes a las condiciones ambientales desfavorables. Algunos de estos trabajos se han basado en la inserción de genes de origen microbiano para las enzimas TPS y/o TPP, con el fin de aumentar la capacidad de síntesis de trehalosa y generar así plantas resistentes a los diferentes tipos de estrés abiótico (las citas de estos trabajos se muestran en la Tabla 1).

Al insertar genes que codifican para la enzima TPS, se han conseguido plantas con una mejor tolerancia a la sequía, salinidad y al estrés oxidativo (Yeo et al., 2000; Lee et al., 2003; Cortina y Culiáñez-Macià, 2005; Yellisetty et al., 2015). A pesar de ello, algunos autores han reportado que las plantas con esta transformación tienen un crecimiento más lento, un menor tamaño, raíces con aberraciones y cambios en el color de las hojas, entre otros (Yeo et al., 2000; Lee et al., 2003; Cortina y Culiáñez-Macià, 2005). Una explicación para este efecto es que la T6P actúa como una molécula señal que regula el metabolismo de carbohidratos, ya que inhibe a la *SNF1-related kinase 1* (SnRK1), enzima que controla la síntesis y degradación de almidón y sacarosa (Lawlor y Paul, 2014; Lunn et al., 2014). Se propone que un aumento en la concentración de T6P está relacionada con un mayor contenido de sacarosa y que, incluso, juega un papel importante en el control de la apertura estomática (Lawlor y Paul, 2014; Figueroa y Lunn, 2016).

En 2007, Miranda y colaboradores, a partir de los genes que codifican para la TPS1 y TPS2 de *S. cerevisiae*, sintetizaron una enzima que combina ambas actividades catalíticas. La ventaja de esta enzima bifuncional es que previene la acumulación de T6P, evitando así alteraciones en el metabolismo de carbohidratos. En dicho trabajo, la sobreexpresión de esta enzima en plantas de *Arabidopsis thaliana*, generó plantas tolerantes a estrés por temperatura, sequía y salinidad.

De manera general, el aumento en la síntesis de trehalosa en plantas les ha conferido una mejor tolerancia a los diferentes tratamientos de estrés a los que fueron sometidas. Estudios como los mencionados anteriormente respaldan la necesidad de continuar desarrollando variedades vegetales tolerantes, así como de investigar a sus características metabólicas.

Tabla 1. Estudios de la transformación de plantas para aumentar su capacidad de síntesis de trehalosa.

Especie	Autores	Gen incorporado
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i> L.)	Suárez et al. (2009)	TPS1-TPS2 (<i>S. cerevisiae</i>)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Miranda et al. (2007)	TPS1-TPS2 (<i>S. cerevisiae</i>)
	Yadev et al. (2014)	TPS y TPP (<i>E. coli</i>)
Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	Garg et al. (2002)	TPS-TPP (<i>E. coli</i>)
	Jang et al. (2003)	TPS-TPP (<i>E. coli</i>)
Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	Yeo et al.(2000)	TPS1 (<i>S. cerevisiae</i>)
Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i> L.)	Yellisetty et al. (2015)	TPS1 (<i>S. cerevisiae</i>)
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	Lee et al. (2003)	TPS1 (<i>S. cerevisiae</i>)
	Pellny et al. (2004)	TPS y TPP (<i>E. coli</i>)
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	Cortina y Culiáñez-Macià (2005)	TPS1 (<i>S. cerevisiae</i>)
	Lyu et al.(2012)	TPS-TPP (<i>S. cerevisiae</i>)
Trigo (<i>Triticum aestivum</i> L.)	Valenzuela-Avendaño (2012)	TPS1-TPS2 (<i>S. cerevisiae</i>)

4. FOTOSÍNTESIS

La fotosíntesis es la vía metabólica por la cual se sintetizan moléculas de carbohidratos a partir de la fijación del dióxido de carbono (CO_2) de la atmósfera, utilizando agua y energía luminosa como sustratos, y generando oxígeno y glucosa como productos. Este proceso lo llevan a cabo organismos como las plantas, algas fotosintéticas (verdes y azules) y algunas especies de bacterias, y es fundamental para el mantenimiento de la vida terrestre (Taiz y Zeiger, 2010).

En las plantas, la fotosíntesis es clave para su crecimiento y desarrollo, ya que a partir de ella se obtiene la energía química necesaria para sostener el resto de los procesos metabólicos (Taiz y Zeiger, 2010). La eficiencia de este proceso representa una limitante en la productividad de los cultivos. En condiciones ambientales normales, se calcula que la eficiencia de conversión de energía de la fotosíntesis en las plantas C_3 es solo del 5% (Parry et al., 2011; Ashraf y Harris, 2013). La fotosíntesis se ve fácilmente afectada por factores ambientales, principalmente por la falta de agua (Ashraf y Harris, 2013). Para fines de su estudio, comúnmente la fotosíntesis se divide en dos fases: la fase luminosa y la fase oscura (también llamada ciclo de Calvin).

4.1 Fase Luminosa

Se le llama fase luminosa a la serie de reacciones de la fotosíntesis que dependen de la captación de la luz solar. Durante este proceso, la energía luminosa, en forma de fotones, incide sobre las moléculas de clorofila, pigmentos almacenados en los cloroplastos de la célula vegetal (Taiz y Zeiger, 2010).

La incidencia de la luz provoca una excitación en los niveles de energía de la clorofila y, una vez que regresa a su estado basal, los electrones son transferidos a la molécula vecina, hasta que alcanzan el fotosistema II (PSII), un complejo proteico donde la molécula de agua es oxidada para generar oxígeno (O_2) y iones H^+ (Taiz y Zeiger, 2010).

Después del PSII, los electrones continúan su paso a lo largo de una serie de proteínas incrustadas en la membrana de los tilacoides, pequeños compartimientos presentes en el interior de los cloroplastos, formando así una cadena de transporte de electrones. Durante el proceso, se genera poder reductor en forma de NADPH_2 , así como un gradiente de protones, el cual impulsa a la síntesis de moléculas de adenosín trifosfato (ATP) por la ATP sintasa del cloroplasto (Taiz y Zeiger, 2010).

4.2 Ciclo de Calvin

El Ciclo de Calvin es el proceso de la fotosíntesis donde se fija el CO_2 atmosférico y es utilizado para la síntesis de azúcares. Aquí, se hace uso del NADPH_2 y ATP generados en la fase luminosa (Taiz y Zeiger, 2010).

El CO_2 entra a la célula a través de los estomas de las hojas y es fijado por la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco), para condensarlo con la ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP), una molécula de cinco carbonos. En las plantas C_3 , el producto de esta primera reacción son dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3PGA), molécula de tres carbonos. El 3PGA es transformado a 1,3-bifosfoglicerato por la enzima fosfoglicerato cinasa, y después a gliceraldehído-3-fosfato (G3P), por la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. La molécula G3P puede ser dirigida hacia la síntesis de azúcares, o bien, hacia la regeneración de RuBP para la continuación del ciclo (Taiz y Zeiger, 2010).

Durante la síntesis de azúcares, el G3P se condensa con dihidroxiacetona fosfato (DHAP), otra molécula de tres carbonos, para la formación de fructosa-1,6-bifosfato (F6P) y glucosa-6-fosfato (G6P) para así finalmente obtener glucosa, molécula de gran importancia en todo el metabolismo energético de la planta (Taiz y Zeiger, 2010).

La síntesis de carbohidratos solo se realiza en los cloroplastos de las hojas, por lo que existe un sistema de transporte a lo largo de toda la planta para movilizar los azúcares hacia otros tejidos que requieren energía, como las raíces y tallos. Los azúcares no pueden ser transportados como monosacáridos, sino únicamente en forma de sacarosa (Taiz y Zeiger, 2010).

Para la producción de sacarosa, el G3P atraviesa la membrana del cloroplasto a través de un sistema de proteínas de transporte de triosas fosfato hacia el citoplasma de la célula vegetal. En este sitio, la SPS cataliza la formación de sacarosa fosfato a partir de la F6P y UDP-glucosa y después la SS forma sacarosa, con la liberación de fosfato inorgánico (Taiz y Zeiger, 2010).

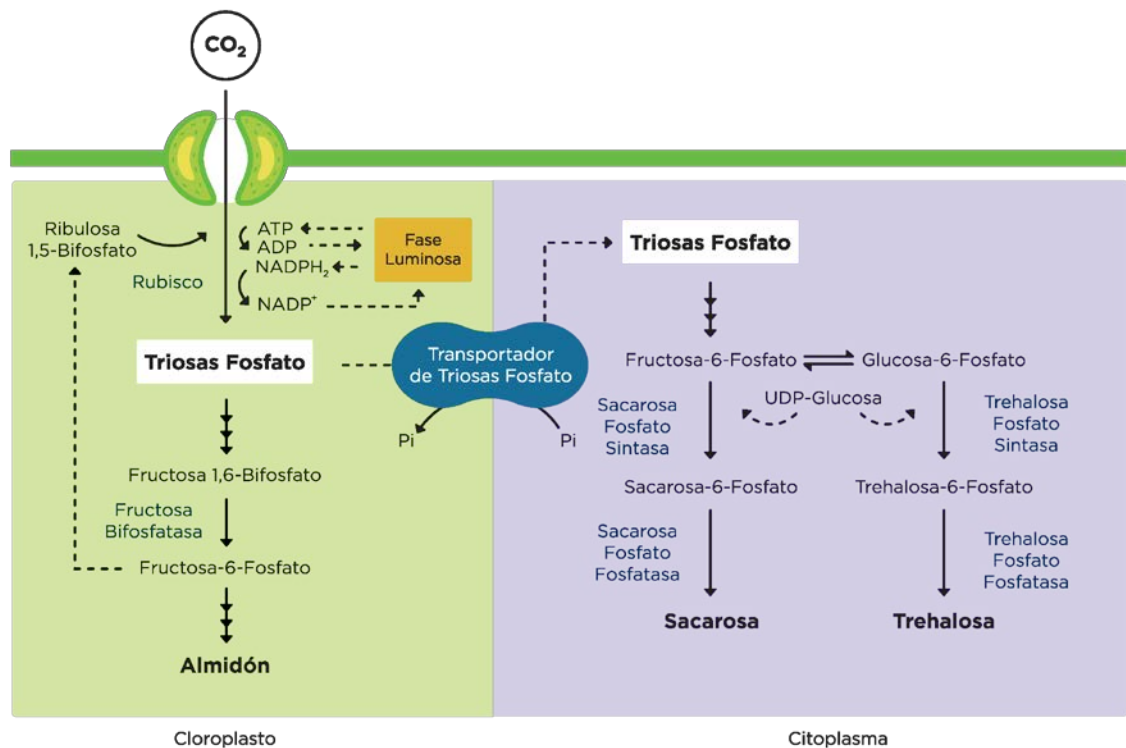


Figura 2. Ciclo de Calvin y síntesis de azúcares en la célula vegetal.

4.2.1 Rubisco

La Rubisco (E.C. 4.1.1.39) es la enzima responsable de la conversión de carbono de su forma inorgánica a orgánica, por lo que su actividad es esencial para el mantenimiento de las cadenas tróficas. Es la proteína más abundante de la Tierra, pues representa un 50% de la proteína presente en los tejidos vegetales (García-Murria, 2006).

En la mayoría de las plantas C3, un mayor contenido de Rubisco está relacionado con una mejor tasa fotosintética. Por ello, algunos autores consideran que un aumento en la concentración de Rubisco mejoraría la supervivencia de las plantas en condiciones de estrés abiótico, principalmente en condiciones de luz y temperaturas altas (Makino, 2011; Parry et al., 2011).

En condiciones saturantes de luz, la concentración y fijación de CO₂ son los factores limitantes para la fotosíntesis en la mayoría de las plantas. Por lo tanto, la actividad de Rubisco y la regeneración de RuBP representan puntos clave para el flujo de esta vía metabólica (Flexas et al., 2004; Galmés et al., 2014; Flexas et al., 2016).

A pesar de la abundancia de la Rubisco, se considera que su eficiencia es muy baja debido a que también presenta afinidad por el oxígeno. En plantas C3 expuestas a estrés, la Rubisco también actúa como oxigenasa en un proceso conocido como fotorrespiración. En la vía fotorrespiratoria, se consumen parte del CO₂ fijado y del ATP generado, lo que representa una pérdida de energía y una menor producción de azúcares (Taiz y Zeiger, 2010). Se ha propuesto que introducir una enzima con alta eficiencia catalítica (mayor afinidad por el CO₂ que por el O₂) es una alternativa para mejorar la fotosíntesis en cultivos expuestos a sequía y temperaturas altas, como en el trigo (Parry et al., 2011; Sharma et al., 2015).

Cuando las plantas C3 se enfrentan a sequía sufren pérdidas en la concentración y actividad de Rubisco. Por ejemplo, Bota y colaboradores (2004) encontraron que, en plantas de frijol y de uva, la actividad de esta enzima disminuye cuando su contenido relativo de agua (CRA) es de un 75%. En plantas de trigo, por su parte, la diferencia en la tolerancia a estrés abiótico entre diversas variedades se atribuye principalmente a la concentración y actividad de Rubisco, pues al comparar variedades tolerantes y sensibles al estrés, no se encontraron diferencias en cuanto a su fotoquímica, pero sí en su intercambio gaseoso (Sharma et al., 2015).

4.2.2 Regulación del Ciclo de Calvin

Además de la actividad de Rubisco, otros puntos de regulación para el ciclo de Calvin están dados por la acción de enzimas implicadas tanto en la síntesis de azúcares, como en la regeneración de RuBP (Kobmann et al., 1994; Simkin et al., 2015; Ding et al., 2016). La fructosa-1,6-bifosfatasa (FBPasa) (E.C. 3.1.3.11) cataliza la liberación de un fosfato de la FBP para la generación de F6P. Esta enzima se considera como una potencial responsable de la pérdida de la fotosíntesis durante el estrés (Ashraf y Harris, 2013). Kobmann y colaboradores (1994) modificaron genéticamente plantas de papa para disminuir la expresión de FBPasa, encontrando una reducción en la tasa fotosintética y un menor crecimiento de estas.

La sedoheptulosa-1,7-bifosfatasa (SBPasa) (E.C. 3.1.3.37) es la enzima encargada de la síntesis de sedoheptulosa-7-fosfato, a partir de la liberación de un fosfato de la molécula de sedoheptulosa-1,7-bifosfato. Existen reportes de que la SBPasa tiene un impacto sobre el aumento en la tasa fotosintética y en una mayor tolerancia al frío (Parry et al., 2011; Simkin et al., 2015; Ding et al., 2016). Simkin y colaboradores (2015) transformaron plantas de tabaco para aumentar la expresión de SBPasa junto a la fructosa-1,6-bifosfato aldolasa (FBPA), otra enzima involucrada en la regeneración de la RuBP. Como resultado se encontró que la sobreexpresión de estas enzimas no solo generó plantas con una mayor tasa fotosintética, sino que también la carboxilación de la Rubisco y el transporte de electrones alcanzaron valores más altos respecto a las plantas no transformadas; además, las plantas tuvieron una mayor producción de biomasa.

Otro de los puntos de regulación más importantes está en la actividad de la fosforribulosa cinasa (PRK) (E.C. 2.7.1.19). La PRK cataliza la síntesis de RuBP mediante la fosforilación de ribulosa-5-fosfato, utilizando una molécula de ATP; esto la convierte en una enzima clave en esta ruta, pues de ella depende directamente la regeneración del primer sustrato para que la fijación de CO₂ pueda seguir llevándose a cabo. En algunas especies de plantas C₃, la regeneración de RuBP es uno de los factores más importantes para que la fotosíntesis continúe llevándose a cabo en condiciones de sequía severa (Bota et al., 2004).

4.3 Efectos de la Sequía sobre la Fotosíntesis

En las plantas, el principal efecto adverso provocado por la sequía ocurre sobre la fotosíntesis. La magnitud de este efecto depende de factores estomáticos, no estomáticos, o ambos, según la especie vegetal. Dentro de las limitaciones estomáticas, están la cantidad, el tamaño y la apertura de los estomas; por su parte, las limitaciones no estomáticas involucran al metabolismo de la planta (Ashraf y Harris, 2013; Feller, 2016). Por ejemplo, las plantas que tienen menos estomas o de menor tamaño, conservan mejor el agua durante periodos de sequía (Mishra et al., 2012; Ashraf y Harris, 2013; Feller, 2016).

En las primeras etapas de la sequía, las plantas cierran sus estomas para evitar la pérdida de agua por transpiración. Como consecuencia del cierre estomático, la asimilación de CO₂ disminuye conforme disminuyen el contenido relativo de agua (CRA) y el potencial hídrico de la planta, lo cual a su vez disminuye la síntesis de carbohidratos (Medrano et al., 2002; Bota et al., 2004; Chaves et al., 2009; Ashraf y Harris, 2013; Flexas et al., 2016). La disminución en la tasa de transpiración provocada por la sequía ocasiona un aumento en la temperatura en la hoja, generando estrés por calor (Lu y Zhang, 1999). Las altas temperaturas pueden inhibir la actividad catalítica de la Rubisco (Parry et al., 2011; Sharma et al., 2015; Feller, 2016).

La apertura estomática está controlada por el ácido abscísico (ABA), una hormona que también participa en otros procesos fisiológicos de las plantas, como la dormancia, floración y promoción de la senescencia (Finkelstein, 2013). El ABA se considera como una hormona señalizadora del estrés, pues participa en la respuesta a estrés abiótico. En condiciones de estrés por sequía, al disminuir la humedad del suelo, se genera un aumento en la concentración de ABA (Feller, 2016). El ABA se sintetiza en la raíz y es transportado en su forma conjugada hacia las hojas a través del xilema; después, el ABA pasa a su forma libre, lo cual promueve el cierre de los estomas en las hojas (Hansen y Dörffling, 1999; Finkelstein, 2013; Feller, 2016).

El estrés por sequía también promueve cambios en la concentración de los pigmentos fotosintéticos, tales como una degradación de las clorofilas. La pérdida del contenido de clorofilas resulta en una menor eficiencia en la absorción de luz y, por lo tanto, en una

menor capacidad fotosintética (Zhang et al., 2011; Ashraf y Harris, 2013). No obstante, en trigo sometido a sequía, Lu y Zhang (1999), reportaron que la asimilación de CO₂ disminuye hasta un 89%, pero no encontraron que el estrés tuviera efecto sobre el contenido de clorofila. Al mismo tiempo, la degradación de clorofila puede ocasionar un desbalance en el transporte de electrones, lo que produce especies reactivas del oxígeno, moléculas que inducen estrés oxidativo (Anjum et al., 2011; Ashraf y Harris, 2013).

Además de las clorofilas, existen otros pigmentos que participan en el proceso fotosintético. Los carotenoides comprenden un grupo de pigmentos con una gran diversidad de estructuras (Taiz y Zeiger, 2010). Se ha descrito que existe una relación directa entre los carotenoides y la síntesis de ABA (Finkelstein, 2013). El ABA es un compuesto de 15 carbonos, producido a partir de la degradación de la violaxantina, una molécula de 40 carbonos. La violaxantina es un pigmento clasificado dentro del grupo de las xantofilas y se sintetiza a partir del β -caroteno en los plastos de la célula vegetal (Parry y Horgan, 1991; Finkelstein, 2013).

El papel de los carotenoides en la fotosíntesis radica en la absorción de longitudes de onda diferentes a las clorofilas, disipando el calor generado por la luz y protegiendo al aparato fotosintético del estrés por temperatura. Además, algunas de estas moléculas pueden actuar como antioxidantes cuando hay generación de especies reactivas de oxígeno en períodos de estrés oxidativo (Parry y Horgan, 1991; Ashraf y Harris, 2013).

Como consecuencia de una disminución del transporte electrónico, también se detiene la producción de ATP y NADPH₂ en la fase luminosa, comprometiendo así la síntesis de azúcares en el ciclo de Calvin. Se sabe que, en plantas de trigo, las variedades que mantienen mejor su contenido de clorofila y fotosíntesis tienen un periodo de llenado de grano más largo y un mejor rendimiento en la producción de semilla (Vijayalakshmi et al., 2010; Sharma et al., 2015).

Los niveles en la concentración y actividad de las enzimas fotosintéticas también se ven afectados por la sequía (Gill et al., 2011; Ashraf y Harris, 2013). Al disminuir la concentración de CO₂ en la célula vegetal, enzimas como la Rubisco y la SPS pierden parte de su actividad. En plantas de *T. aestivum*, la sequía severa (CRA de 80%), la actividad fotosintética disminuye hasta 75% comparado con plantas sin estrés (Lu y Zhang, 1999; Chaves et al., 2009).

4.4 Síntesis de Trehalosa y Fotosíntesis Bajo Condiciones de Estrés

Si bien, se conoce que la trehalosa está implicada en la tolerancia a diferentes tipos de estrés abiótico en plantas, también se ha encontrado que puede estar relacionada con la conservación de la fotosíntesis (Jang et al., 2003; Lee et al., 2003; Cortina y Culiáñez-Macià, 2005; Lyu et al., 2012; Pellny et al., 2012). Por ejemplo, Chang y colaboradores (2014) encontraron que la aplicación exógena de trehalosa contrarrestó los efectos dañinos de la salinidad sobre la pérdida de agua y la fotosíntesis en plantas de *Catharanthus roseus*.

Por su parte, algunos de los trabajos anteriormente mencionados en la Tabla 1, también concluyeron que existe una relación entre la síntesis de trehalosa y una mejor fotosíntesis. Al aumentar la actividad de las enzimas TPS y TPP en las plantas de arroz de Jang y colaboradores (2003), se encontró que estas tuvieron una tasa fotosintética más alta aun al ser sometidas a diferentes tipos de estrés abiótico; resultados similares se obtuvieron en las plantas transgénicas de tomate sometidas a sequía de Lyu y colaboradores (2012). Por su parte, la inserción del gen de *S. cerevisiae* que codifica para la enzima TPS1, generó plantas con un mayor contenido de clorofila y acumulación de almidón (Lee et al., 2003; Cortina y Culiáñez-Macià, 2005). Asimismo, Pellny y colaboradores (2004) encontraron que las plantas de tabaco transformadas para aumentar la actividad de TPS y TPP, tuvieron un aumento en su capacidad fotosintética y una mejor actividad de Rubisco. También, al estudiar las plantas de trigo transformadas por Valenzuela-Avendaño (2012), se encontró que la sobreexpresión del gen *ScTPS1-TPS2* llevó a obtener plantas con una fotosíntesis más eficiente, no solo al ser sometidas a condiciones de salinidad y sequía, sino también al encontrarse sin estrés (Cabral-Torres, 2014; Romero-Reyes, 2016).

Es evidente que, además de promover una mejor tolerancia al estrés, un aumento de la síntesis de trehalosa en plantas también está involucrada en el mantenimiento de su fotosíntesis (Jang et al., 2003; Lee et al., 2003; Cortina y Culiáñez-Macià, 2005; Lyu et al., 2012; Pellny et al., 2012). Debido a la susceptibilidad del proceso fotosintético frente al estrés abiótico, principalmente al estrés por sequía, la transformación con genes para

las enzimas TPS y TPP podría representar una alternativa para mantener la productividad de los cultivos agrícolas aun en condiciones adversas.

Resulta entonces pertinente generar mayor conocimiento de las implicaciones metabólicas que tiene la modificación genética de estas plantas. Si bien, estudios como los citados anteriormente reportan que la fotosíntesis mejora al aumentar la síntesis de trehalosa, es poca la información que se tiene respecto a lo que ocurre en el metabolismo del ciclo de Calvin de estas plantas transformadas. Estudiar el efecto de la trehalosa sobre la fase oscura de la fotosíntesis, permitirá elucidar si la mejora en este proceso se debe a la actividad de las enzimas que participan en el ciclo de Calvin.

5. HIPÓTESIS

La fotosíntesis en las plantas transformadas con la enzima TPS-TPP, es más eficiente porque la transformación impacta sobre la actividad de las enzimas que regulan el ciclo de Calvin.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo General

Analizar el efecto de la transformación con la enzima bifuncional TPS-TPP sobre la actividad de las enzimas clave del ciclo de Calvin en plantas de trigo sometidas a sequía.

6.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar los cambios en la fotosíntesis de las plantas durante el tratamiento de sequía.
2. Cuantificar el contenido relativo de agua, carbohidratos y clorofila a, b y total en los diferentes días de sequía.
3. Determinar cambios en la actividad de las enzimas Rubisco, FBPasa y SPS a lo largo del tratamiento de sequía.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Material Biológico

Se utilizaron tres líneas de semillas transformadas de trigo (*T. aestivum* L.) variedad Kronstad F2004 con el gen *ScTPS1-TPS2* de *S. cerevisiae*, que codifica para la enzima bifuncional trehalosa fosfato sintasa-trehalosa fosfato fosfatasa (TPS-TPP). Una línea cuenta con la transformación dirigida por el promotor de expresión constitutiva del virus del mosaico de la coliflor CaMV35S (línea 35S) y dos líneas con la transformación dirigida por el promotor de expresión inducible por estrés abiótico rd29A (líneas RD1B y RD1C) (Valenzuela-Avendaño, 2012).

7.2 Obtención de Plantas

Previo a la germinación, las semillas fueron sometidas a un tratamiento de limpieza con Tween20 al 0.05%, durante 30 min y uno de desinfección con una solución de Plant Preservative Mixture (PPM) al 10% por 20 min, según lo establecido por Cabral-Torres (2014).

Las semillas se pusieron a germinar en cajas Petri con un papel filtro húmedo en condiciones de oscuridad, a una temperatura de 25 °C. Una vez desarrollado el hipocotilo, las plántulas fueron expuestas a luz, en periodos de 16 h de luz y 8 h de oscuridad hasta la emergencia de la raíz; después se trasplantaron en charolas con tierra.

Las plantas se trasplantaron en macetas una vez que desarrollaron la primera hoja y fueron llevadas al invernadero ubicado en el Departamento de Agricultura y Ganadería de la Universidad de Sonora, donde se mantuvieron en condiciones de luz y temperatura ambiente, en el periodo de diciembre de 2017 hasta abril de 2018.

7.3 Tratamiento de Sequía

El tratamiento de sequía inició una vez que las plantas cumplieron las 7 semanas de edad. Se suspendió el riego y se monitoreó la humedad del suelo con un higrómetro, hasta que esta alcanzó un valor de 30%; a partir de entonces se contaron los 0, 2, 4, 6 y 8 días de sequía.

7.4 Cuantificación del Contenido Relativo de Agua

Para determinar el estado de hidratación de las plantas a lo largo del tratamiento de sequía, se cuantificó su contenido relativo de agua (CRA), de acuerdo a la técnica de Slavik (1974). Se tomó una parte de una hoja de la planta y se pesó para registrar su peso fresco (PF). Después, la muestra se dejó en hidratación en una caja Petri saturada con agua destilada hasta peso constante y así obtener el peso turgente (PT). Posteriormente, la muestra se dejó secar en una estufa VWR modelo Symphony (Pennsylvania, EUA) a 70 °C hasta peso constante para obtener el peso seco (PS). El CRA se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{CRA (\%)} = \frac{\text{PF} - \text{PS}}{\text{PT} - \text{PS}} \times 100 \quad (1)$$

7.5 Medición de Parámetros Fotosintéticos y Curvas de CO₂

La actividad fotosintética se midió con un equipo *LCi Portable Photosynthesis System* (ADC Bioscientific Ltd, Hertfordshire UK). Se obtuvieron los parámetros de tasa

fotosintética (A), concentración intercelular de CO₂ (C_i) y tasa de transpiración (E). Las curvas de CO₂ se obtuvieron variando la concentración de CO₂ de 50 hasta 1000 µmoles de CO₂ m⁻² s⁻¹ y se analizaron con el programa A/Ci Curve Fitting Utility versión 2.0 diseñado por Sharkey y colaboradores (2007).

7.6 Cuantificación de Clorofilas y Carotenoides

Se determinó la concentración de clorofila total y de carotenoides a partir del método descrito por Lichtenhalter (1987). Se pesaron 0.1 g de tejido vegetal, se congeló con nitrógeno líquido y se pulverizó en un mortero con mano. Al polvo fino obtenido se le agregaron 1.5 mL de acetona al 80% fría. Se mezcló la muestra en vórtex Thermoline modelo M16715 (Thermoline, Iowa, USA) durante 2 min y después se centrifugó en una centrífuga Thermo Scientific modelo SL16R (Langselbold, Alemania) a 10000 rpm a 4 °C por 3 min. Se recuperó el sobrenadante y se repitió el procedimiento con el precipitado remanente, hasta extraer todo el color verde. El sobrenadante recuperado se aforó a un volumen de 10 mL con acetona al 80% fría y se midió la absorbancia a las longitudes de onda de 663, 647 y 470 nm. El contenido de pigmentos se calculó a partir de las fórmulas siguientes:

$$\text{Clorofila total (mg/L)} = (7.15 \times \text{Abs}_{663\text{nm}}) + (18.7 \times \text{Abs}_{647\text{nm}}) \quad (4)$$

$$\text{Carotenoides (mg/L)} = \frac{(1000 \times \text{Abs}_{470\text{nm}}) - (1.82 \times \text{Clorofila a}) - (85.02 \times \text{Clorofila b})}{198} \quad (5)$$

7.7 Cuantificación de Carbohidratos

Para cuantificar la concentración de trehalosa y sacarosa se prepararon extractos acuosos y etanólicos. Se pesaron 0.75 g de hojas de trigo, las cuales se congelaron con nitrógeno líquido y se pulverizaron en un mortero para obtener un polvo fino. Para los extractos acuosos se añadieron 3.75 mL de agua, mientras que para los extractos etanólicos se añadieron 3.75 mL de etanol al 80%. Las muestras se mezclaron en vórtex y se incubaron a 50 °C por 24 h; después se centrifugaron a 10000 rpm por 15 min, se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones. Se ajustó el volumen del sobrenadante recuperado hasta 3 mL con el solvente correspondiente. El análisis de las muestras se realizó por la técnica HPLC con un equipo Dionex ED50 utilizando una pre-columna Dionex-CarboPac PA10 de 4 x 50 mm y una columna Dionex-CarboPac PA10 de 4 x 250 mm. Se usó agua como eluyente a un flujo de 1 mL/min y NaOH 300 mM post-columna. La concentración de cada uno de los azúcares se calculó en base a una curva de calibración utilizando estándares comerciales.

7.8 Obtención de Extractos Enzimáticos

Los extractos enzimáticos utilizados para los ensayos de actividad se obtuvieron según lo descrito por Li y colaboradores (2016). Se pesó 1 g de tejido, se congeló con nitrógeno líquido y se pulverizó en un mortero con mano. Se añadieron 3 mL de búffer de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 8, con EDTA 1 mM, MgCl₂ 1 mM, glicerol al 12.5%, β -mercaptoetanol 10 mM y PVP al 10%). La muestra se centrifugó a 10000 rpm por 20 min a 4 °C en una centrífuga Thermo Scientific modelo SL16R (Langselbold, Alemania), se recuperó el sobrenadante y se centrifugó nuevamente con las mismas condiciones. El sobrenadante remanente se almacenó a -80 °C en un ultracongelador VWR modelo 5703 (Thermofischer Scientific, Ohio, USA) hasta su uso.

7.9 Ensayo de Actividad de Rubisco

La actividad de Rubisco se midió conforme al método descrito en Li y colaboradores (2016) con algunas modificaciones. Primero se realizó un paso de activación de la enzima, añadiendo 80 μ L de extracto enzimático a una mezcla de activación con búfer Tris-HCl 33 mM pH 7.5, EDTA 0.67 mM, $MgCl_2$ 33 mM y $NaHCO_3$ 10 mM, en un volumen final de 100 μ L. La mezcla se incubó durante 30 min a 25 °C. Después, el ensayo de actividad se realizó usando la mezcla de reacción compuesta por HEPES 5 mM pH 8, $MgCl_2$ 2 mM, EDTA 0.1 mM, DTT 0.25 mM, ATP 0.5 mM, fosfocreatina 0.5 mM, RuBP 0.06 mM, 1 U de creatina fosfocinasa, 1 U de 3-fosfoglicerato fosfocinasa, 1 U de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, $NaHCO_3$ 1 mM y NADH 0.015. A la mezcla anterior, se agregaron 20 μ L del extracto previamente activado para dar inicio a la reacción, en un volumen final de 0.5 mL. Se siguió el cambio en la absorbancia a 340 nm durante 3 min para medir la oxidación del NADH en un espectrofotómetro Varian modelo Cary 50 (Victoria, Australia). Una unidad de actividad se define como un μ mol de NAD^+ formado por min por mL.

7.10 Ensayo de Actividad de Fructosa-1,6-bifosfatasa

Para medir la actividad de FBPasa se siguió el ensayo descrito por Zimmermann y colaboradores (1976). Se mezclaron Tris-HCl 100 mM pH 8.8, $MgCl_2$ 10mM, EDTA 0.5 mM, $NADP^+$ 0.3 mM, 0.6 U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 1.2 U de fosfoglucosa isomerasa y extracto enzimático, en un volumen final de 0.5 mL. Se dio inicio a la reacción añadiendo fructosa-1,6-bifosfato 0.6 mM y se siguió el cambio en la absorbancia a 366 nm por 3 min. Una unidad de actividad se define como un μ mol de NADPH formado por min por mL.

7.11 Ensayo de Actividad de Sacarosa Fosfato Sintasa

La actividad de SPS se determinó según la técnica descrita por Huber (1981). En una primera reacción, se llevó a cabo la formación de sacarosa. Se añadieron 14 μL de extracto enzimático a una mezcla de HEPES 40 mM pH 7.5, UDP-glucosa 8 mM, F6P 8 mM y MgCl_2 15 mM, en un volumen final de 0.07 mL. La mezcla se incubó por 10 min a 25 °C y después se sumergió en agua hirviendo por 30 segundos para detener la reacción.

En la segunda reacción, se cuantificó la sacarosa formada. Se añadieron 70 μL de NaOH 1 N a la mezcla anterior y se hirvió durante 10 min para destruir la F6P que no reaccionó. La muestra se enfrió a temperatura ambiente; después se añadieron 250 μL de resorcinol al 1% disuelto en etanol, y 750 μL de HCl al 30%. Se incubó la muestra a 80 °C por 8 min y después se enfrió en hielo, se centrifugó a 1600 xg por 5 min, para después medir la absorbancia a 520 nm. La concentración de sacarosa se midió a partir de una curva de calibración.

7.12 Cuantificación de Proteína

La concentración de proteína de los extractos enzimáticos se cuantificó por el método de Bradford (1976), usando una curva de calibración de albúmina de suero bovino como referencia.

7.13 Análisis Estadístico

El efecto del tratamiento de sequía sobre las plantas se evaluó utilizando un análisis de varianza de una vía, con un nivel de $P \leq 0.05$. Para identificar diferencias entre las líneas

de plantas se utilizó una prueba de Tukey con un nivel de $P \leq 0.05$. Los datos se analizaron con el software NCSS versión 2007.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Germinación y Desarrollo de las Plantas de Trigo

Para la realización de este trabajo, se generaron plantas de trigo *T. aestivum* de diferentes líneas. Se sometieron semillas de trigo a un proceso de germinación y se obtuvieron plantas no transformadas (NT), plantas transformadas con el promotor CaMV35S (línea 35S) y plantas transformadas con el promotor rd29A (líneas RD1B y RD1C). Los porcentajes y tiempo total de germinación de las cuatro líneas de plantas de trigo se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Porcentajes de germinación total de las líneas de semillas de trigo.

Línea	Germinación (%)	Tiempo máximo (h)
NT	100	24
35S	77	72
RD1B	100	48
RD1C	100	48

Durante el proceso de germinación se observaron diferencias en cuanto al tiempo de inicio de la emergencia de la raíz de las diferentes líneas. Las semillas NT germinaron en su totalidad a las 24 h, mientras que, en ese mismo lapso, las semillas RD1B germinaron en un 94% y tanto las 35S como las RD1C, un 74% (Tabla 2). A las 48 h, germinaron las semillas RD1B y RD1C restantes (Tabla 2). Por su parte, la línea 35S no solo tuvo el porcentaje total de germinación más bajo, sino que también tuvo el crecimiento más lento comparada con el resto de las líneas de plantas.

Las líneas de plantas continuaron mostrando diferencias notables a lo largo de su desarrollo. Las plantas RD1B formaron la segunda hoja antes que el resto de las líneas; sin embargo, las plantas RD1C tuvieron un mayor número de hojas y con un ancho de la

hoja más grande que el resto de las líneas. Las plantas 35S mantuvieron un crecimiento retardado y generaron hojas notablemente más delgadas y alargadas que las otras líneas de plantas (Anexo 1).

En las plantas de trigo de este trabajo, la expresión constitutiva del gen *ScTPS1-TPS2* en la línea 35S tuvo un efecto en el tiempo de germinación y en el desarrollo de las plantas, mientras que las líneas transformadas RD1B y RD1C no mostraron tener afectaciones durante su desarrollo. Existen en la bibliografía numerosos reportes de que la modificación de plantas para sobreexpresar genes que aumenten la actividad de la enzima TPS, genera cambios morfológicos en estos organismos, causados por acción de la T6P como molécula señalizadora del metabolismo de azúcares, resultando en plantas con menor crecimiento y tamaño (Lunn et al., 2014; Figueroa y Lunn, 2016).

La enzima bifuncional TPS-TPP cataliza la síntesis de trehalosa evitando la acumulación de T6P (Miranda et al., 2007). En las plantas de arroz de Jang y colaboradores (2003), la expresión constitutiva de una enzima bifuncional TPS-TPP de *E. coli*, no tuvo efectos sobre la tasa de crecimiento o la fisiología de las plantas; sin embargo, en plantas de papa, esta misma transformación generó plantas con alteraciones fenotípicas y con muerte prematura.

En base a lo observado para las plantas de trigo en este trabajo, es posible que el efecto de la síntesis constitutiva de trehalosa dependa no solo de la especie vegetal, sino también de su etapa fisiológica.

8.2 Contenido Relativo de Agua de las Plantas de Trigo Durante el Tratamiento de Sequía

Para conocer la respuesta de las diferentes líneas de plantas de trigo ante la falta de agua, estas fueron sometidas a sequía. Se determinó el contenido relativo de agua (CRA) a lo largo de los días del tratamiento de sequía para conocer el efecto del déficit de agua sobre el estado de hidratación de las plantas de trigo (Tabla 3).

El CRA en las plantas de la línea NT y 35S sin estrés era de 75.6 y 76%, respectivamente. En ambas líneas, este valor aumentó en el día dos y tuvo una disminución a partir del cuarto día del tratamiento de sequía. En el día ocho, el CRA en las plantas NT fue 44%, mientras que en las 35S fue de 63% (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto del tratamiento de sequía sobre el CRA de las plantas de trigo.

Sequía (d)	CRA (%)			
	NT	35S	RD1B	RD1C
0	75.6±4.5	76.0	84.0±0.2	86.1±0.4
2	79.3±0.16	79.2	78.3±5.1	81.1±0.1
4	64.9±6.8	72.9	79.3±5.2	72.7±12.1
6	43.8±10.4	70.6	64.2±13.7	47.1±1.7
8	44.1±11.2	63.0	62.9±3.5	43.9±4.4

Los datos corresponden a la media de $n=2 \pm$ desviación estándar.

Debido a que para la línea 35S solo se contaba con una muestra biológica para llevar a cabo esta determinación, no fue posible aplicar el análisis estadístico, por lo que los resultados del CRA se considerarán únicamente como indicador de que hubo pérdida de agua en estas plantas.

Las líneas RD1B y RD1C tenían un CRA más alto que las plantas NT y 35S en el día cero. En la línea RD1B, las plantas sin estrés tenían un CRA de 84% y este disminuyó en el día dos. En el día ocho de sequía, el CRA en las plantas RD1B fue de 62.9%, igual que en las 35S (Tabla 3). Las plantas de la línea RD1C, en el día cero tuvieron un CRA de 86.1% y este disminuyó conforme aumentó la sequía. Para el último día de tratamiento de sequía, las plantas RD1C tuvieron un CRA de 43.9% (Tabla 3).

Todas las líneas de plantas mostraron una disminución en su CRA a lo largo del tratamiento (Tabla 3). El tratamiento de ocho días sin riego provocó la pérdida del 41.8% del CRA en las plantas NT. La disminución del CRA fue menor en las líneas transformadas 35S y RD1B, las cuales perdieron 17% y 25% de su CRA, respectivamente, mientras que la línea RD1C fue la que registró la mayor pérdida del CRA respecto al resto de las líneas, la cual fue de 48%.

El mantenimiento y aumento de los valores del CRA observados durante los primeros cuatro días del tratamiento en las plantas NT, 35S y RD1B, puede ser consecuencia del ajuste osmótico mediado por la síntesis de algunos metabolitos, ya que en plantas de trigo en condiciones de sequía, se ha reportado un incremento en la concentración de prolina, así como de otros aminoácidos como isoleucina, valina y aminoácidos de cadena ramificada (Bowne et al., 2012; Habash et al., 2014; Mishra et al., 2017).

El tratamiento de sequía afectó el estado de hidratación de todas las plantas de trigo, donde las más afectadas alcanzaron un CRA de hasta menos del 45% en el día ocho del tratamiento. La disminución del CRA en las plantas de trigo es un indicador de la baja disponibilidad de agua y, por lo tanto, de que las plantas están en estrés hídrico. El nivel de la severidad del estrés depende de la especie y de la edad de la planta. Algunos autores consideran que en *T. aestivum* un CRA de 80% como estrés severo (Lu y Zhang, 1999), mientras que otros lo consideran cuando el CRA alcanza hasta el 50% o del 40%, dependiendo de si es *T. aestivum* o *T. durum*, respectivamente (Bowne et al., 2012; Gupta et al., 2012; Habash et al., 2014).

8.3 Fotosíntesis Luminosa en las Plantas de Trigo durante el Tratamiento de Sequía

La fase luminosa de la fotosíntesis ocurre cuando la luz incide sobre las moléculas de clorofila dentro de los cloroplastos. En esta fase, el agua es la fuente de los protones (H^+) que generan un gradiente electroquímico a lo largo de la membrana tilacoidal, a partir del cual se genera ATP y $NADPH_2$ (Taiz y Zeiger, 2010). Este proceso resulta crucial para las plantas, ya que les provee de energía para la síntesis de carbohidratos durante el ciclo de Calvin; sin embargo, al ser el agua el sustrato principal, la fotosíntesis luminosa puede verse afectada cuando las plantas se encuentran en condiciones de sequía (Taiz y Zeiger, 2010).

8.3.1 Contenido de Clorofila y Carotenoides

El contenido de clorofila total en las plantas de trigo NT sin estrés era de 1.1 mg gPS⁻¹, y este se vio afectado ($P \leq 0.05$) una vez iniciado el tratamiento de sequía (Fig. 3A). La clorofila total en las plantas NT disminuyó hasta 72% en el día seis y, en el día ocho, su concentración fue de 0.5 mg gPS⁻¹ (Fig. 3A). Por el contrario, los carotenoides en las plantas NT aumentaron ($P \leq 0.05$) su concentración conforme aumentó el grado de sequía (Fig. 3B). En el día cero, las plantas NT tenían 0.07 mg de carotenoides gPS⁻¹ y estos aumentaron hasta 0.12 mg gPS⁻¹ para el final del tratamiento (Fig. 3B).

Las plantas de la línea 35S tuvieron una concentración de clorofila total tres veces menor ($P \leq 0.05$) que las otras líneas en el día cero (Fig. 3A). Aunque entre el segundo y sexto día de sequía la concentración de clorofila fue significativamente más alta, en el día ocho del tratamiento, esta tuvo un valor de 0.4 mg gPS⁻¹ (Fig. 3A). La línea 35S no mostró diferencias ($P \geq 0.05$) en el contenido de carotenoides respecto a las plantas NT sin estrés (Fig. 3B). Al día dos de sequía, hubo un aumento ($P \leq 0.05$) en su concentración, la cual disminuyó para el día ocho, donde los carotenoides fueron de 0.06 mg gPS⁻¹ (Fig. 3B).

La línea RD1B en el día cero tuvo 0.9 mg de clorofila g PS⁻¹. La concentración de este pigmento disminuyó ($P \leq 0.05$) durante la sequía y al día ocho, la clorofila total fue de 0.7 mg gPS⁻¹ (Fig. 3A). Respecto a los carotenoides, al igual que la línea 35S, las plantas RD1B tuvieron la misma ($P \geq 0.05$) concentración que las plantas NT en el día cero (Fig. 3B). A partir del día dos de sequía, los carotenoides tuvieron una concentración variable, la cual en el día ocho fue de 0.13 mg gPS⁻¹ (Fig. 3B).

Las plantas de la línea RD1C tuvieron un contenido de clorofila total más alto ($P \leq 0.05$) en comparación del resto de las líneas de trigo en el día cero (Fig. 3A). El contenido inicial de clorofila fue 1.2 mg gPS⁻¹ y este disminuyó ($P \leq 0.05$) a lo largo de los días. En el día ocho, la línea RD1C tuvo el mismo nivel de clorofila que la línea RD1B (0.7 mg gPS⁻¹) (Fig. 3A). Los carotenoides fueron también significativamente más altos en las plantas RD1C en el día cero que en las otras líneas de plantas (Fig. 3B), pero estos disminuyeron ($P \leq 0.05$) durante el tratamiento de sequía. En el día ocho la concentración de carotenoides en las plantas RD1C fue de 0.13 mg gPS⁻¹ (Fig. 3B).

La disminución en el contenido de clorofila total de las líneas de plantas de trigo corresponde con la disminución del CRA durante el tratamiento de sequía (Tabla 3). Al final del tratamiento de sequía, el contenido de clorofila total fue más bajo en las plantas transformadas 35S, mientras que la línea RD1B no mostró diferencias respecto a las plantas NT, y la línea RD1C tuvo la concentración de clorofila total más alta. Estos resultados concuerdan parcialmente con lo reportado en plantas de tabaco y tomate que sobreexpresan la TPS1, ya que estas plantas tuvieron una mejor conservación de la clorofila respecto a las plantas no transformadas (Lee et al., 2003; Cortina y Culiáñez-Macià, 2005).

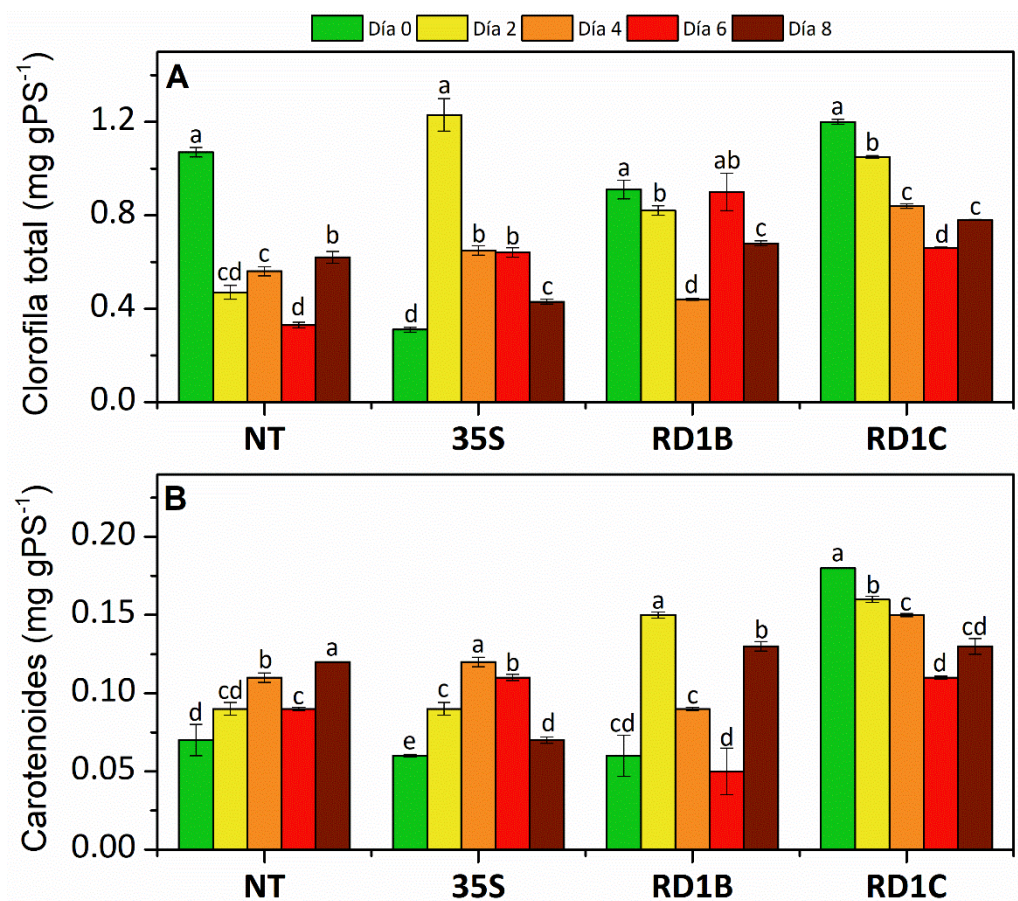


Figura 3. Contenido de pigmentos fotosintéticos en las líneas de plantas de trigo durante el tratamiento de sequía. Contenido de clorofila total (panel A) y carotenoides (panel B) en las plantas de trigo durante el tratamiento de sequía. Los valores corresponden a la media de $n=3 \pm$ desviación estándar. Literales diferentes indican diferencias significativas entre los días del tratamiento ($P \leq 0.05$).

Si bien, se sabe que la degradación de clorofilas es uno de los factores que limitan la fotosíntesis en las plantas en condiciones de estrés abiótico (Anjum et al., 2011), en algunas especies podría no ser realmente la limitante principal, ya que otros factores como el intercambio gaseoso y actividad de la Rubisco tienen mayor influencia en el mantenimiento de la eficiencia fotosintética (Bota et al., 2004; Flexas et al., 2016).

El aumento en la concentración de carotenoides en las plantas de trigo NT podría relacionarse con una generación de estrés oxidativo ocasionado por la sequía, ya que se sabe que estos pigmentos actúan como protección ante las especies reactivas de oxígeno generadas cuando la fase luminosa de la fotosíntesis se ve afectada por la degradación de clorofilas (Ashraf y Harris, 2013). Además, el aumento significativo en los pigmentos observado en las plantas NT en el día ocho, después de que estos habían disminuido en días anteriores, puede ser consecuencia de la acción del ABA durante el estrés por sequía, pues se ha encontrado que existe una relación directa entre la concentración de ABA y de clorofila total y carotenoides en la hoja (Barickman et al., 2014).

En las plantas transformadas RD1C, a pesar de la disminución de las clorofilas, no hubo aumentos en el contenido de carotenoides, lo que indicaría que el tratamiento de sequía no generó estrés oxidativo en esta línea. Por otro lado, en las líneas 35S y RD1B, el contenido de carotenoides tuvo un comportamiento variable a lo largo del tratamiento de sequía. Esto podría significar que los carotenoides participaron en la captación de luz a la par que las clorofilas, debido a su capacidad de absorber diferentes longitudes de onda (Ashraf y Harris, 2013).

8.3.2 Actividad del Transporte de Electrones

Las curvas de CO_2 (o curvas A/C_c) para las plantas de trigo se realizaron en los días cero y ocho del tratamiento de sequía (Fig. 4).

Las gráficas de las curvas de CO_2 muestran que, tanto para las plantas NT como para las líneas transformadas, la tasa fotosintética disminuyó notablemente en el día ocho de sequía (Fig. 4). En el día cero, la tasa fotosintética observada (A_{obs}) aumenta conforme aumenta la concentración de CO_2 en el cloroplasto (C_c). La caída en la gráfica de A_{obs} del día ocho de sequía indica que la fotosíntesis en las plantas no aumentó ante incrementos de C_c , contrario a lo observado en el día cero (Fig. 4).

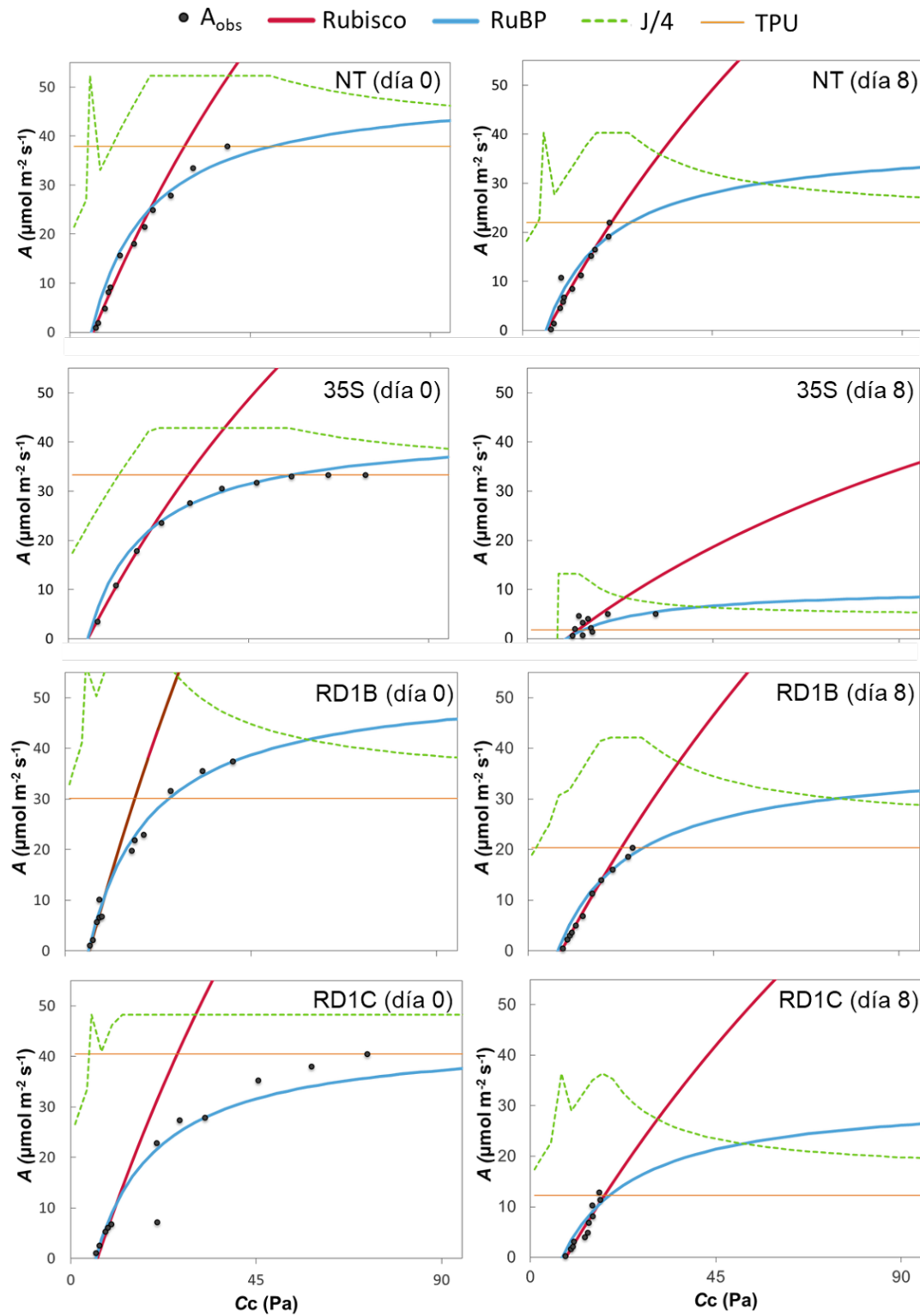


Figura 4. Curvas de CO_2 de las líneas de plantas de trigo sin estrés y a los ocho días del tratamiento de sequía. Respuesta de la tasa fotosintética (A) a cambios en la concentración de CO_2 en el cloroplasto (C_c).

Las curvas de CO₂ muestran cambios en las gráficas correspondientes a los factores involucrados en el mantenimiento de la fotosíntesis, tales como el transporte de electrones, la actividad de Rubisco y la regeneración de RuBP, los cuales, a su vez, impactan sobre la producción de triosas fosfato (Fig. 4). En las gráficas del día ocho, se observa un declive en las gráficas de los diferentes parámetros involucrados en la actividad fotosintética. Todos los parámetros disminuyeron de forma más evidente en la línea 35S (Fig. 4), mientras que en las gráficas correspondientes para las líneas RD1B y RD1C en el día ocho de sequía (Fig. 4), no se observan grandes diferencias respecto a las plantas NT (Fig. 4). El programa de análisis de curvas A/Cc permite también estimar numéricamente los parámetros fotosintéticos que afectan la tasa fotosintética por la sequía, tales como la actividad del transporte de electrones (J) (Tabla. 4).

Tabla 4. Cambios en la actividad del transporte de electrones de las plantas de trigo antes y después del tratamiento de sequía.

	Línea							
	NT		35S		RD1B		RD1C	
Sequía (d)	0	8	0	8	0	8	0	8
J ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	209	96	108	25	142	85	129	73

Cambios en la actividad del transporte electrónico (J), calculado a partir de la ecuación de Sharkey y colaboradores (2007).

El valor de J en las plantas NT tuvo una disminución de 54% (Tabla 4), mientras que en las plantas transformadas, J disminuyó 77% en la línea 35S, 40% en la línea RD1B y 44% en la línea RD1C (Tabla 4).

La disminución en el valor de J coincide con los cambios en la concentración de clorofila total. En las plantas NT, la degradación de la clorofila total (Fig. 3A) influyó en la disminución de la actividad en el transporte de electrones al final del tratamiento de sequía. Esto explicaría también la generación de estrés oxidativo, evidenciada por aumentos en el contenido de carotenoides (Fig. 3B).

En la línea 35S, es probable que la baja tasa de transporte de electrones sea consecuencia del bajo contenido de clorofila total que tuvieron estas plantas (Fig. 3A) y no porque se generó estrés oxidativo. En contraste, las plantas RD1B y RD1C mantuvieron mejor su contenido de clorofila total a los ocho días de sequía, respecto a las plantas NT y 35S, lo que les permitió conservar la actividad del transporte de electrones.

8.4 Intercambio Gaseoso de las Plantas de Trigo Durante el Tratamiento de Sequía

Para conocer el efecto del tratamiento de sequía sobre el intercambio gaseoso de las diferentes líneas de plantas de trigo, se determinaron la tasa fotosintética, concentración intercelular de CO₂ y la tasa de transpiración.

8.4.1 Tasa Fotosintética (A)

La tasa fotosintética en las plantas NT sin estrés fue de 17 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. La fotosíntesis fue mayormente afectada ($P \leq 0.05$) en el día seis y, en el día ocho el valor de A en las plantas NT fue de 14 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 5). La fotosíntesis en la línea 35S tuvo un comportamiento similar al de las plantas NT (Fig. 5). La tasa fotosintética en las plantas 35S en el día cero era de 16 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y este valor disminuyó ($P \leq 0.05$) a partir del día seis de sequía, el cual fue de 12 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en el día ocho (Fig. 5).

Las plantas transformadas RD1B y RD1C sin estrés tenían una fotosíntesis de 21 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, la cual fue más alta ($P \leq 0.05$) en comparación con las plantas NT y 35S en el día cero (Fig. 5). En la línea RD1B, la tasa fotosintética no tuvo cambios significativos hasta el día ocho de sequía, donde el valor de A fue de 19 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 5). Por su parte, la fotosíntesis en la línea RD1C se mantuvo sin cambios ($P \geq 0.05$) hasta el final del tratamiento de sequía (Fig. 5).

La tasa fotosintética de las plantas de trigo NT tuvo una recuperación en el día ocho después de haber registrado su valor más bajo en el día seis. Ya que el tratamiento de sequía consistió en únicamente ocho días sin riego, es probable que la tasa fotosintética en las plantas NT nuevamente disminuyera si el estrés se hubiese prolongado. Resultados similares se han reportado por Balla y colaboradores (2014), quienes al estudiar la fotosíntesis de variedades de *T. aestivum* tolerantes y sensibles a altas temperaturas, encontraron que la variedad sensible perdió un 60% de su tasa fotosintética a los seis días de sequía, pero esta se recuperó al día nueve; no obstante, la fotosíntesis decayó nuevamente a los once días de estrés.

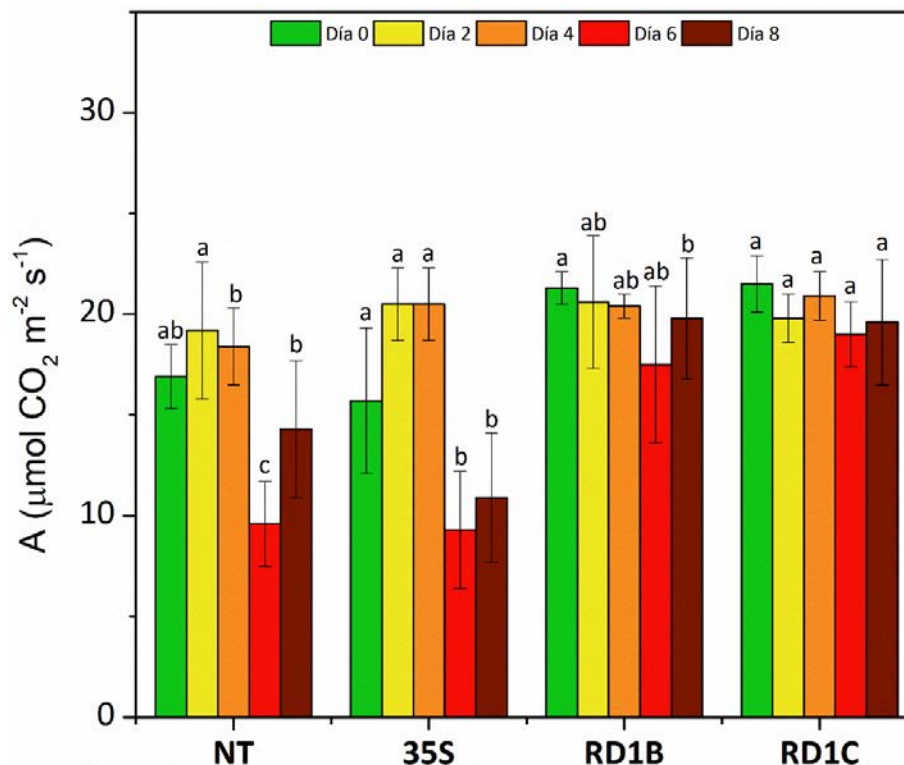


Figura 5. Tasa fotosintética (A) de las líneas de plantas de trigo durante el tratamiento de sequía. Los valores corresponden a la media de $n=6 \pm$ desviación estándar. Literales diferentes indican diferencias significativas entre los días del tratamiento ($P \leq 0.05$).

8.4.2 Concentración Intercelular de CO₂ (*C_i*)

El parámetro *C_i*, también denominado concentración intercelular de CO₂, es un indicador de la cantidad de CO₂ que atraviesa los estomas y se encuentra fuera de la célula vegetal en el espacio intercelular. En el día cero, el *C_i* en las plantas de trigo 35S y RD1B fue 380 y 395 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, respectivamente y este no mostró diferencias ($P \geq 0.05$) respecto al valor del *C_i* en las plantas NT (Fig. 6). Para el final del tratamiento de sequía, las plantas NT no tuvieron cambios significativos en el *C_i* respecto al valor que tenían en el día cero (Fig. 6).

El *C_i* en las plantas 35S disminuyó ($P \leq 0.05$) a partir del día seis, mientras que en la línea RD1B, el *C_i* fue más bajo ($P \leq 0.05$) a partir del cuarto día de sequía (Fig. 6). Las plantas RD1C tuvieron un *C_i* inicial más bajo ($P \leq 0.05$) en comparación con el resto de las líneas (320 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$) (Fig. 6). El valor promedio del *C_i* en la línea RD1C fue variable a lo largo de los días, pero el análisis estadístico no arrojó diferencias significativas entre estos valores, probablemente debido a la alta desviación estándar (Fig. 6). Para el final del tratamiento, las tres líneas de plantas transformadas tuvieron un *C_i* de alrededor de 260 $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol}^{-1}$, el cual fue menor ($P \leq 0.05$) en comparación con las plantas NT en el día ocho (Fig. 6).

Las plantas de trigo RD1B y RD1C tuvieron un *C_i* más bajo respecto a las NT en el día ocho de sequía, mientras que su tasa fotosintética se mantuvo más alta. Este comportamiento en los parámetros fotosintéticos encontrado para las plantas de trigo de este trabajo coincide con lo reportado en la bibliografía. Shangguan y colaboradores (1999) también encontraron una relación inversa entre el *C_i* y la tasa fotosintética en plantas de trigo, ya que, bajo un tratamiento de sequía, las plantas tuvieron un aumento en el *C_i* cuando la deshidratación fue mayor, mientras que la actividad fotosintética disminuyó en un 33%.

A su vez, Gupta y colaboradores (2012) reportaron que en plantas de *T. aestivum*, la aplicación exógena de poliaminas y fitorreguladores (sustancias conocidas por mejorar la tolerancia a sequía en plantas) provocó un aumento en su tasa fotosintética pero una menor

concentración interna de CO₂ en comparación de las plantas control en condiciones de estrés hídrico.

En la línea 35S, la fotosíntesis disminuyó a la par del *Ci*. Es posible que en las plantas NT y 35S, la disminución de la tasa fotosintética se deba principalmente a factores no estomáticos, como la actividad de las enzimas del ciclo de Calvin. Por otro lado, en las líneas RD1B y RD1C, el aumento de la tasa fotosintética junto a una disminución del *Ci*, indicarían que la disminución del CO₂ intercelular se debió a que el CO₂ estaba siendo utilizado como sustrato para mantener la fotosíntesis a pesar del alto grado de estrés.

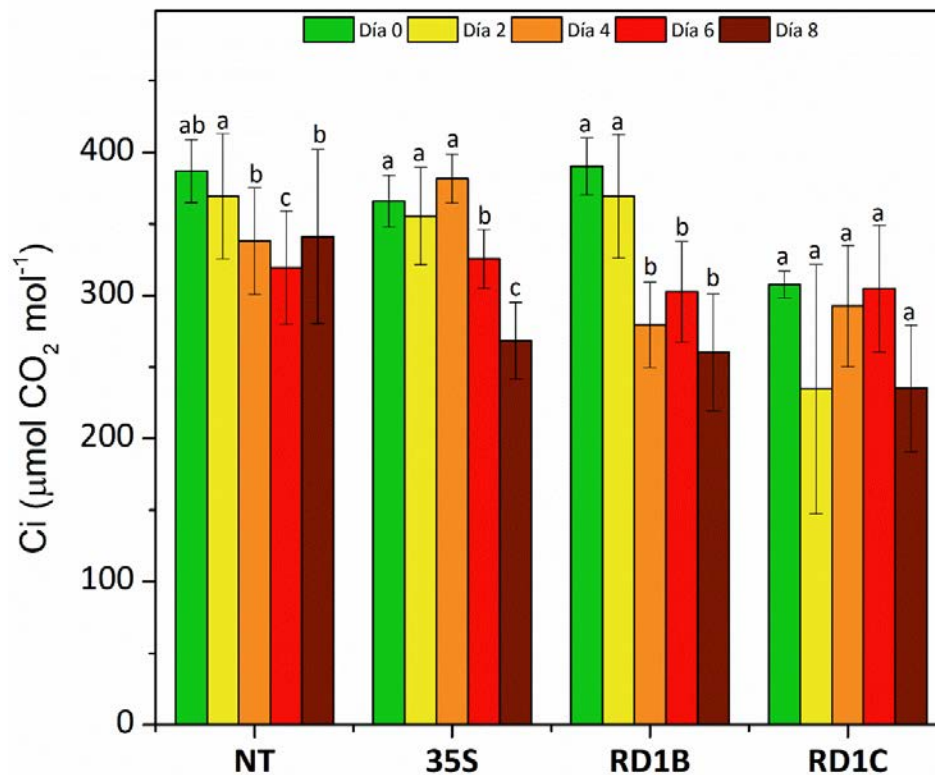


Figura 6. Concentración subestomática de CO₂ (*Ci*) en las líneas de plantas de trigo durante el tratamiento de sequía. Los valores corresponden a la media de $n=6 \pm$ desviación estándar. Literales diferentes indican diferencias significativas entre los días del tratamiento ($P \leq 0.05$).

8.4.3 Tasa de Transpiración (E)

Las plantas NT tuvieron una E más alta ($P \leq 0.05$) que las plantas de trigo transformadas sin estrés (Fig. 7). En el día cero, E en las plantas NT era de $6.7 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y este valor disminuyó ($P \leq 0.05$) al aumentar el grado de sequía. Al octavo día del tratamiento, las plantas NT tuvieron una E de $3 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (Fig. 7).

En la línea 35S, E se mantuvo sin cambios ($P \geq 0.05$) hasta el día seis de sequía (Fig. 7). En el día ocho, el valor de E en las plantas 35S fue 40% más bajo ($P \leq 0.05$) respecto a los días anteriores, disminuyendo al mismo nivel que las plantas NT (Fig. 7). La transpiración en las plantas RD1B en el día cero fue $4 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. El valor de E tuvo variaciones durante el tratamiento, pero en el día ocho, las plantas RD1B no mostraron diferencias ($P \geq 0.05$) en su transpiración respecto al día cero (Fig. 7). En la línea RD1C, las plantas sin estrés tuvieron una E de $5 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ y esta se mantuvo sin cambios significativos hasta el día ocho de sequía (Fig. 7).

Los resultados de E muestran que hubo una disminución en la transpiración en las plantas de trigo NT conforme aumentó el grado de sequía. Esto evidencia que las plantas NT cerraron los estomas como una respuesta ante la sequía, ocasionando una disminución en la tasa fotosintética. Este resultado, así como los incrementos en el contenido de los pigmentos fotosintéticos (Fig. 3), indicarían que la concentración de ABA aumentó en las plantas NT debido a la sequía, promoviendo el cierre de los estomas. No obstante, en la línea 35S, aunque también disminuyeron la tasa fotosintética y la transpiración, los pigmentos fotosintéticos se mantuvieron en menor concentración que en las NT (Fig. 3). Las líneas transformadas RD1B y RD1C tuvieron una E más alta en los días de mayor grado de sequía en comparación con las plantas NT, indicando que los estomas se mantuvieron abiertos durante el tratamiento de sequía. Esto puede considerarse como un indicador de tolerancia a la sequía, pues las variedades de *T. aestivum* más tolerantes a condiciones ambientales desfavorables mantienen su transpiración hasta un 46% más alta que las variedades más sensibles (Balla et al., 2014).

La transformación con la enzima bifuncional TPS-TPP mejoró la fotosíntesis de las plantas transformadas con el promotor de respuesta a estrés, pero no en las plantas transformadas con el promotor de expresión constitutiva. Las plantas NT y 35S sufrieron

una caída de los valores de A , C_i y E en el día ocho de sequía. Esto indica que la disminución en la concentración subestomática de CO_2 fue provocada por el cierre estomático ante la sequía. En contraste, las plantas de las líneas RD1B y RD1C mantuvieron valores de A y E más altos que las plantas NT y disminuyeron su C_i , lo que significaría que estas plantas no cerraron sus estomas durante la sequía, por lo que la baja concentración de CO_2 subestomático estaría relacionado a una mayor fijación por Rubisco.

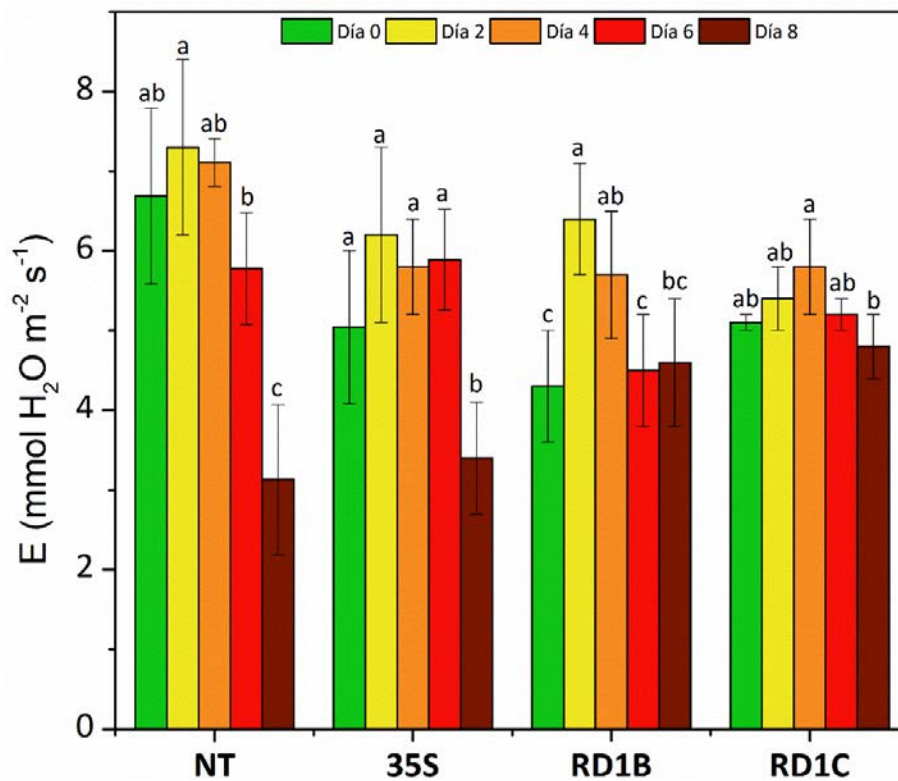


Figura 7. Tasa de transpiración (E) de las líneas de plantas de trigo durante el tratamiento de sequía. Los valores corresponden a la media de $n=6 \pm$ desviación estándar. Literales diferentes indican diferencias significativas entre los días del tratamiento ($P \leq 0.05$).

8.5 Ciclo de Calvin en las Plantas de Trigo durante Sequía

Para conocer el efecto del tratamiento de sequía sobre el ciclo de Calvin en las plantas de trigo, se determinó la actividad de las enzimas involucradas en la regulación de este ciclo, así como en la síntesis de azúcares.

8.5.1 Actividad de Rubisco

La actividad de Rubisco en las plantas de trigo NT era de $120 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ y esta disminuyó ($P \leq 0.05$) a partir del segundo día de sequía (Fig. 8). En el día cuatro, la actividad de Rubisco en las plantas NT fue de $35 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, valor que permaneció sin cambios ($P \geq 0.05$) hasta el día ocho (Fig. 8). Al final de la sequía, las plantas NT tuvieron una actividad de Rubisco más baja ($P \leq 0.05$) en comparación de las líneas transformadas (Fig. 8).

Tanto en la línea 35S como en la RD1B, la Rubisco inicialmente tuvo una actividad de $40 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Fig. 8). En el día dos, la Rubisco aumentó su actividad a $75 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ en la línea 35S y a $65 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ en la línea RD1B (Fig. 8). En ambas líneas, la actividad de Rubisco tuvo un comportamiento similar, pues a partir del día cuatro de sequía se mantuvo sin cambios ($P \geq 0.05$); sin embargo, en el día ocho la actividad enzimática en las plantas 35S fue 13% más baja ($P \leq 0.05$) que en la línea RD1B (Fig. 8). La Rubisco en la línea transformada RD1C mantuvo una actividad más alta ($P \leq 0.05$) respecto a las otras líneas de trigo a lo largo de todo el tratamiento de sequía (Fig. 8). En el día cero, la actividad de Rubisco fue $148 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$. La actividad fue variable entre el segundo y el sexto día de sequía (Fig. 8). En el día ocho la actividad de Rubisco en la línea RD1C fue $120 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, casi cuatro veces más alta ($P \leq 0.05$) que en las plantas NT (Fig. 8).

Las tres líneas de plantas de trigo transformadas mantuvieron mejor la actividad de Rubisco durante la sequía respecto a las plantas NT. Los resultados para la actividad de Rubisco coinciden con lo encontrado en los parámetros fotosintéticos (Fig. 5, 6 y 7).

En la línea 35S, a pesar de que la Rubisco mantuvo su actividad durante el tratamiento de sequía, el cierre estomático provocó una disminución de la captación de CO_2 y, por lo tanto, una menor fotosíntesis para el final del tratamiento. En las líneas RD1B y RD1C, la fotosíntesis se mantuvo durante la sequía debido a que continuaron tanto la captación como la fijación de CO_2 . Además, en las plantas RD1C, los bajos valores del C_i respecto a las otras líneas de plantas (Fig. 6) podrían deberse a que, por la alta actividad de carboxilación por Rubisco, el CO_2 se encontraba dentro del cloroplasto como sustrato de esta enzima y no en el espacio intercelular de la hoja.

Dentro de los trabajos con plantas modificadas genéticamente para aumentar su actividad de TPS y/o TPP, es poca la información que se tiene respecto a la actividad enzimática de Rubisco. Pellny y colaboradores (2004) reportaron que la sobreexpresión de la TPS en plantas de tabaco generó plantas con un mayor contenido de Rubisco y, por lo tanto, una actividad de carboxilación más alta. En contraste, la sobreexpresión de la TPP provocó que las plantas de tabaco tuvieran una menor concentración de esta enzima, pero no mostraron diferencias significativas en cuanto a su actividad respecto a las plantas no transformadas. En este trabajo, la sobreexpresión de la enzima bifuncional TPS-TPP tuvo un efecto en la actividad de Rubisco de las plantas de trigo, manteniendo su actividad aun durante el tratamiento de sequía.

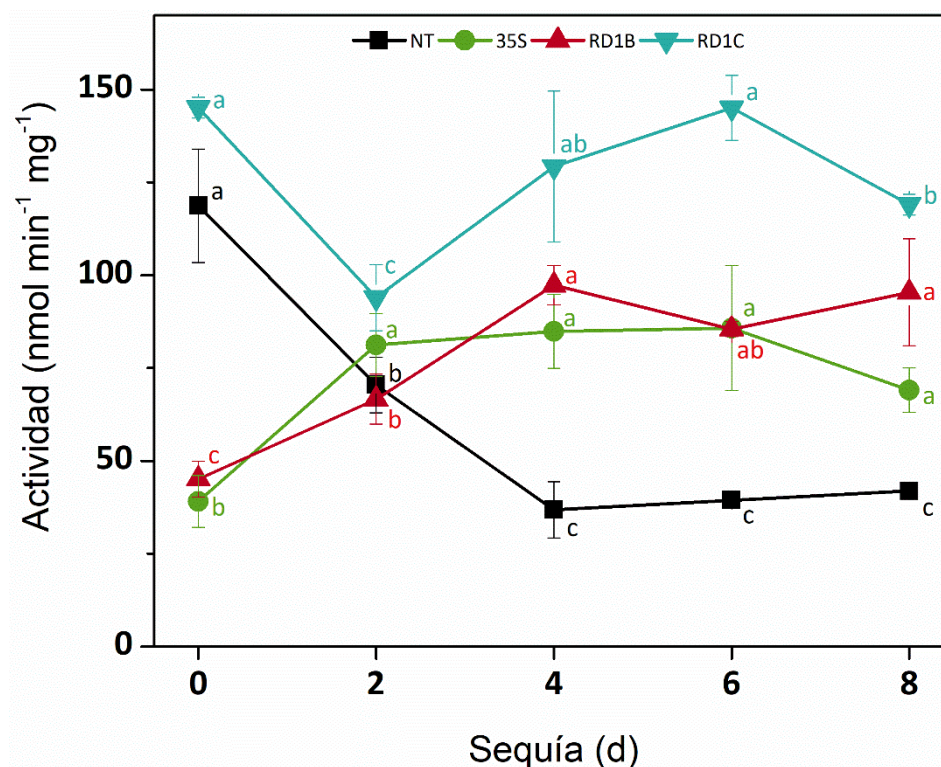


Figura 8. Actividad de Rubisco en las líneas de plantas de trigo durante el tratamiento de estrés por sequía. Los valores corresponden a la media de $n=5 \pm$ desviación estándar. Literales diferentes indican diferencias significativas entre los días del tratamiento ($P \leq 0.05$).

8.5.2 Actividad de Fructosa 1,6-bifosfatasa

En las plantas de trigo sin estrés, la actividad de FBPasa fue mayor ($P \leq 0.05$) en las plantas NT que en las líneas transformadas (Fig. 9). En el día cero, la FBPasa en las plantas NT tuvo una actividad de $240 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ y esta disminuyó ($P \leq 0.05$) 33% en el día dos del tratamiento. Al sexto día de sequía la FBPasa tuvo una actividad de $120 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ y este valor se mantuvo sin cambios ($P \leq 0.05$) hasta el día ocho (Fig. 9).

En las plantas 35S, la actividad de FBPasa fue menor ($P \leq 0.05$) en comparación con las otras líneas transformadas y las plantas NT (Fig. 9). La actividad de FBPasa en la línea 35S se mantuvo en $130 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ y no tuvo cambios ($P \geq 0.05$) hasta el día seis. En el día ocho, la actividad de esta enzima aumentó ($P \leq 0.05$) a $180 \text{ nmoles min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Fig. 9).

La línea RD1B tuvo una actividad inicial de FBPasa de 210 nmoles min⁻¹ mg⁻¹, la cual disminuyó ($P \leq 0.05$) en el día dos de sequía (Fig. 9). En los días cuatro y seis, las plantas RD1B tuvieron su nivel de actividad de FBPasa más alto ($P \leq 0.05$) y, en el día ocho esta disminuyó ($P \leq 0.05$) a su nivel inicial (Fig. 9). En la línea RD1C, la actividad de FBPasa en el día cero fue de 195 nmoles min⁻¹ mg⁻¹. La actividad de esta enzima tuvo cambios graduales a lo largo del tratamiento y, en el día ocho de sequía, fue de 120 nmoles min⁻¹ mg⁻¹ (Fig. 9).

En las plantas de trigo NT, la FBPasa disminuyó su actividad un 50% cuando el grado de sequía fue mayor (Fig. 9). En las plantas transformadas, la sobreexpresión de la enzima bifuncional TPS-TPP afectó la actividad de FBPasa de manera distinta en cada una de las líneas. En la línea 35S, la actividad de FBPasa fue más baja en comparación a las otras líneas, mientras que en la línea RD1B, la actividad de FBPasa aumentó en el día cuatro de sequía y en las plantas RD1C, la actividad se mantuvo sin grandes cambios (Fig. 9).

La FBPasa se considera una enzima clave en la regulación del ciclo de Calvin, ya que el producto de su reacción, la fructosa-6-fosfato, participa como sustrato inicial para la síntesis de almidón dentro del cloroplasto, o bien, puede ser dirigida hacia la regeneración de RuBP. Una menor actividad de FBPasa significaría que las triosas fosfato son dirigidas a la síntesis de sacarosa en el citoplasma (Kobmann et al., 1994).

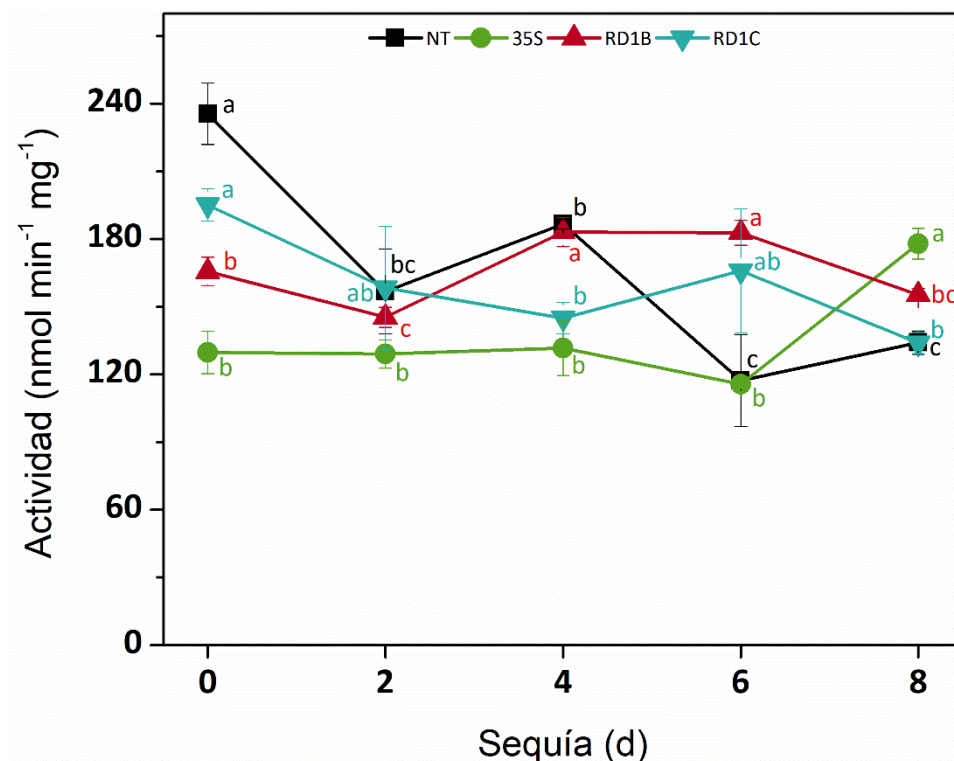


Figura 9. Actividad de FBPasa en las líneas de plantas de trigo durante el tratamiento de estrés por sequía. Los valores corresponden a la media de $n=5 \pm$ desviación estándar. Literales diferentes indican diferencias significativas entre los días del tratamiento ($P \leq 0.05$).

En las plantas de trigo NT, la disminución en la actividad de FBPasa por la sequía, disminuyó la regeneración de RuBP y, por lo tanto, provocó la disminución de la fotosíntesis y actividad de Rubisco. En la línea 35S, debido a que el gen *ScTPS1-TPS2* se expresa de forma constitutiva, se favoreció la salida de las triosas fosfato hacia el citoplasma, disminuyendo la actividad de FBPasa. Por otro lado, en las plantas transformadas RD1B y RD1C la disminución significativa en la actividad de FBPasa en el día ocho podría deberse a que la síntesis de trehalosa aumentó cuando el grado de estrés se hizo más alto, debido al promotor de respuesta a estrés.

Lo anterior no coincide con lo reportado por Pellny y colaboradores (2004), ya que a pesar de que las plantas de tabaco transformadas para sobreexpresar la enzima TPS tuvieron una mayor actividad de Rubisco, no encontraron cambios significativos en cuanto a la actividad de FBPasa. Sin embargo, los autores proponen que la transformación pudo

influir en el estado de activación de dichas enzimas, lo cual a su vez podría afectar positivamente la regeneración de RuBP.

8.5.3 Actividad de Sacarosa Fosfato Sintasa

Inicialmente, la actividad de SPS fue más alta ($P \leq 0.05$) en las plantas NT respecto a las líneas transformadas (Fig. 10). Las plantas NT tuvieron una actividad de SPS de $26 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ en el día cero. Al segundo día de sequía, la SPS tuvo una disminución ($P \leq 0.05$) en su actividad, la cual recuperó ($P \leq 0.05$) su nivel inicial al día cuatro (Fig. 10). A partir del día seis, la actividad de SPS en las plantas NT disminuyó ($P \leq 0.05$) y en el día ocho fue de $8 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Fig. 10).

La actividad de SPS en las plantas transformadas 35S fue de $21 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ en el día cero (Fig. 10). Esta enzima disminuyó ($P \leq 0.05$) su actividad en el día dos y tuvo variaciones hasta el final del tratamiento de sequía. En el día ocho, la actividad de SPS fue de $6 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ (Fig. 10).

En las plantas transformadas RD1B, la SPS en el día cero tuvo una actividad de $17 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, disminuyendo ($P \leq 0.05$) casi tres veces para el segundo día de sequía (Fig. 10). En el día cuatro y seis, el valor de la actividad de SPS fue más alto pero los cambios no fueron significativos (Fig. 10). En el día ocho del tratamiento de sequía, la actividad de SPS en la línea RD1B fue igual ($P \geq 0.05$) que en las plantas NT y 35S (Fig. 10).

La línea RD1C tuvo una actividad de SPS más baja ($P \leq 0.05$) respecto al resto de las líneas de plantas de trigo durante la mayor parte del tratamiento de sequía (Fig. 10). La actividad inicial de SPS en las plantas RD1C fue de $10 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ y este valor no tuvo cambios ($P \geq 0.05$) a lo largo de los días de sequía (Fig. 10).

Los resultados de la actividad de SPS pueden relacionarse a la actividad de FBPasa, debido a la relación que existe entre ambas enzimas (Kobmann et al., 1994). En las plantas de trigo NT, la actividad de SPS se mantuvo sin grandes cambios hasta el día ocho, mientras que la actividad de FBPasa disminuyó en el día seis de sequía. La disminución en la actividad de FBPasa en las plantas NT podría relacionarse con una mayor síntesis de

sacarosa para mantener otros tejidos, como la raíz, conforme el grado de sequía se hacía más alto. Estos resultados podrían explicar la pérdida en la tasa fotosintética (Fig. 5) en términos de que las triosas fosfato no fueron dirigidas a la regeneración de RuBP, disminuyendo la actividad del ciclo de Calvin.

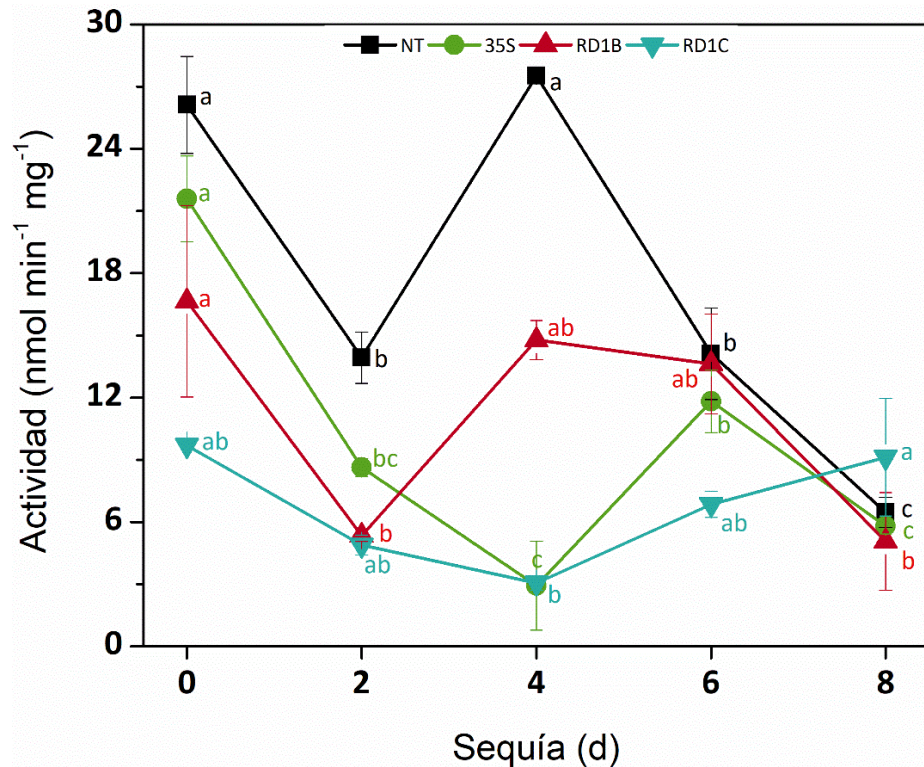


Figura 10. Actividad de SPS en las líneas de plantas de trigo durante el tratamiento de estrés por sequía. Los valores corresponden a la media de $n=5 \pm$ desviación estándar. Literales diferentes indican diferencias significativas entre los días del tratamiento ($P \leq 0.05$).

En la línea 35S, mientras que la actividad de FBPasa se mantuvo sin grandes cambios, y fue más baja en comparación con las otras líneas de plantas, la actividad de SPS varió a lo largo de los días. De forma similar, la SPS en la línea RD1B tuvo variaciones en su actividad durante los días de sequía, aunque en esta línea, la actividad de FBPasa se mantuvo más alta en comparación con las plantas 35S. Las variaciones en la actividad de

SPS en las líneas 35S y RD1B podrían deberse a la competencia entre la síntesis de sacarosa y de trehalosa por las triosas fosfato en el citoplasma de la célula.

La línea RD1C mantuvo una baja actividad de SPS en comparación con su actividad de FBPasa, indicando que las triosas fosfato fueron mayormente dirigidas a la regeneración de RuBP y/o acumulación de almidón dentro del cloroplasto. Además, mientras las plantas NT, 35S y RD1B tuvieron menos síntesis de sacarosa en el día ocho, el alto grado de sequía no disminuyó la actividad de SPS en las plantas RD1C. Esto significaría que en la línea RD1C, el mantenimiento de una alta actividad fotosintética (Fig. 5) y de una alta actividad de Rubisco (Fig. 8) permitieron a estas plantas mantener el suministro de carbono, tanto para la regeneración de RuBP como para la síntesis de azúcares.

8.6 Contenido de Azúcares en las Plantas de Trigo durante Sequía

Para complementar la información sobre la actividad de las enzimas del ciclo de Calvin, así como el efecto de la transformación con el gen *ScTPS1-TPS2*, sobre la respuesta de las plantas transformadas ante el estrés por sequía, se cuantificó el contenido de sacarosa y trehalosa.

8.6.1 Contenido de Sacarosa

En las plantas NT, la concentración de sacarosa aumentó ($P \leq 0.05$) conforme aumentó el grado de sequía hasta el día seis (Fig. 11A). En el día cero, el contenido de sacarosa en las plantas NT fue de $20 \mu\text{g gPS}^{-1}$ (Fig. 11A). La concentración de sacarosa tuvo su nivel más alto ($P \leq 0.05$) en el sexto día de sequía ($60 \mu\text{g gPS}^{-1}$) y este fue 42% más bajo ($P \leq 0.05$) en el día ocho (Fig. 11A).

La línea 35S tuvo su contenido de sacarosa más alto en el día cero (Fig. 11A). A partir del día dos del tratamiento de sequía, la sacarosa disminuyó ($P \leq 0.05$) y fue más baja respecto

a las otras líneas de plantas de trigo (Fig. 11A). En las plantas RD1B la sacarosa tuvo una concentración inicial de 22 $\mu\text{g gPS}^{-1}$ (Fig. 11A). A partir del día seis de sequía, la sacarosa en la línea RD1B fue 50% más baja ($P \leq 0.05$) respecto al día cero y este nivel se mantuvo en el día ocho (Fig. 11A).

La concentración de sacarosa en las plantas RD1C varió ($P \leq 0.05$) a lo largo de todo el tratamiento de sequía (Fig. 11A). En el día cero, la línea RD1C tuvo un contenido de sacarosa de 10 $\mu\text{g gPS}^{-1}$, la cual fue menor ($P \leq 0.05$) en comparación del resto de las líneas de plantas (Fig. 11A). En el día ocho, las tres líneas transformadas tuvieron el mismo ($P \geq 0.05$) nivel de sacarosa, el cual fue tres veces menor ($P \leq 0.05$) respecto a las plantas NT (Fig. 11A).

El contenido de sacarosa en las plantas NT coincide con la actividad de SPS (Fig. 10), la cual indica que durante los días cuatro y seis, cuando la sequía era moderada, hubo síntesis de sacarosa para sustentar otros tejidos como la raíz. Sin embargo, para el día ocho las plantas NT perdieron gran parte de la actividad de SPS (Fig. 10) y, por lo tanto, tenían una menor concentración de sacarosa (Fig. 11A), lo cual pudo ser consecuencia del alto grado de estrés por sequía.

En las plantas de la línea 35S, la concentración de sacarosa fue menor en comparación del resto de las líneas (Fig. 11A). A pesar de que la SPS en las plantas 35S mantuvo su actividad durante el tratamiento de sequía (Fig. 10), el bajo contenido de sacarosa podría indicar que este azúcar fue degradado por las invertasas citoplasmáticas para generar glucosa-6-fosfato, sustrato de la enzima TPS, y dirigirse a la síntesis de trehalosa debido a la expresión constitutiva del gen bifuncional *ScTPS1-TPS2*.

Tanto la línea RD1B como la RD1C tuvieron una actividad más baja de SPS durante la mayor parte de los días de sequía en comparación con la actividad en la línea 35S (Fig. 10). A pesar de ello, las líneas RD1B y RD1C tuvieron más sacarosa que las plantas 35S una vez iniciado el tratamiento de sequía (Fig. 11A). Estos resultados pueden explicarse por el tipo de promotor con el que fueron transformadas estas líneas. Es posible que la expresión constitutiva del gen bifuncional bajo el promotor CaMV35S dirigiera la sacarosa sintetizada por la SPS y SPP a su degradación para usar la glucosa-6-fosfato como sustrato de la TPS.

La demanda por sacarosa en las plantas transformadas con el promotor rd29A fue diferente. Las plantas de la línea RD1B mantuvieron niveles más altos de sacarosa entre los días cero y cuatro (Fig. 11A). A partir del día seis, la concentración de sacarosa en la línea RD1B disminuyó, probablemente como consecuencia de la expresión del gen *ScTPS1-TPS2* bajo el promotor de respuesta a estrés, por lo cual la sacarosa se dirigió hacia la síntesis de trehalosa para enfrentar la sequía. En las plantas transformadas RD1C, la concentración de sacarosa tuvo un aumento importante a partir del día dos de sequía y, aunque tuvo variaciones entre los días dos y seis, en base a la actividad de SPS, la demanda por sacarosa fue mayor a partir del sexto día, pues fue el día en el cual se registró un aumento en la actividad de SPS para esta línea.

La baja concentración de sacarosa en la línea 35S podría relacionarse con el menor crecimiento y desarrollo de estas plantas, ya que la disponibilidad de sacarosa se considera como un factor determinante para el crecimiento vegetal (Figueroa y Lunn, 2016). La sacarosa es uno de los productos más importantes obtenidos a partir de la fijación de carbono y esta se sintetiza en el citoplasma de las células fotosintéticas una vez que disminuye la fotosíntesis luminosa, a partir del almidón acumulado en el cloroplasto durante el día (Figueroa y Lunn, 2016).

8.6.2 Contenido de Trehalosa

Inicialmente, cuando las plantas de trigo no se encontraban en sequía, el contenido de trehalosa fue dos veces más alto ($P \leq 0.05$) en la línea 35S respecto a las plantas NT y las líneas RD1B y RD1C (Fig. 11B). A partir del día dos de sequía, hubo un aumento ($P \leq 0.05$) en la concentración de trehalosa en las plantas NT hasta el día seis, donde tuvo su contenido más alto. En el día ocho, la trehalosa disminuyó ($P \leq 0.05$) a $100 \mu\text{g gPS}^{-1}$ (Fig. 11B)

En la línea 35S la concentración de trehalosa fue variable en los diferentes días del tratamiento de sequía (Fig. 11B). Por su parte, las líneas transformadas RD1B y RD1C, la trehalosa tuvo un aumento ($P \leq 0.05$) en su concentración a partir del día cuatro en la línea

RD1B y del día ocho en la RD1C; para el último día de sequía, ambas líneas tuvieron un contenido de trehalosa de 90 $\mu\text{g gPS}^{-1}$ (Fig. 11B).

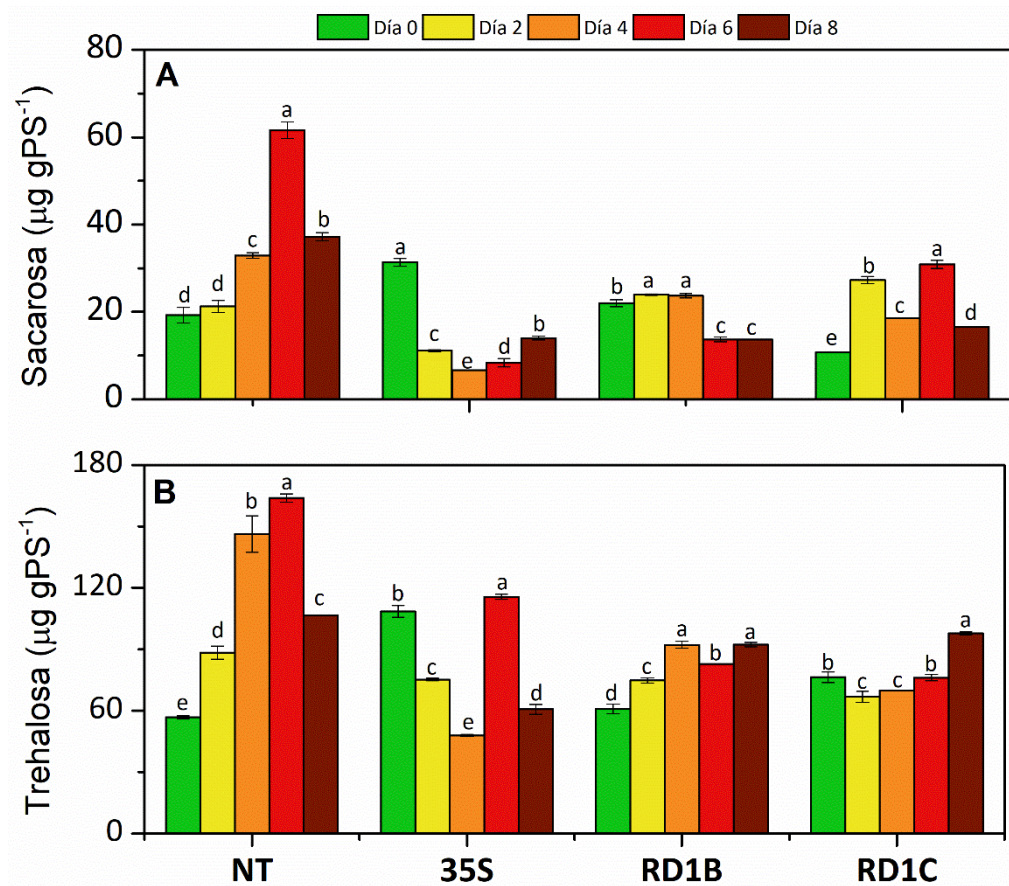


Figura 11. Contenido de sacarosa (panel A) y trehalosa (panel B) en las plantas de trigo durante el tratamiento de sequía. Los valores corresponden a la media de $n=5 \pm$ desviación estándar. Literales diferentes indican diferencias significativas entre los días del tratamiento ($P \leq 0.05$).

En todas las líneas de plantas de trigo se detectó una mayor concentración de trehalosa en comparación con la sacarosa, incluso en las plantas NT (Fig. 11). La sacarosa, al igual que la trehalosa, participa en el ajuste osmótico en plantas de trigo durante sequía y salinidad, pero se sabe que la vía de síntesis de sacarosa puede llegar a ser hasta mil veces más activa que la de síntesis de trehalosa (El-Bashiti et al., 2005; Figueroa y Lunn, 2016; Paul et al., 2018). Sin embargo, se ha reportado que en *T. aestivum*, la magnitud en la acumulación

de osmolitos puede ser mayor cuando el estrés ocurre en etapas fisiológicas tempranas o sucede de forma gradual (Shangguan et al., 1999).

Las plantas de trigo NT acumularon más sacarosa, pero también más trehalosa, que las plantas de trigo transformadas con el gen *ScTPS1-TPS2*. Sin embargo, la diferencia en la concentración de azúcares podría deberse al efecto de la transformación sobre el ciclo de Calvin, puesto que la actividad enzimática de Rubisco, FBPasa y SPS en las plantas transformadas sí fue diferente respecto a las plantas NT y entre las tres líneas transgénicas. En este trabajo, aunque las plantas de trigo fueron transformadas para aumentar su síntesis de trehalosa, las plantas NT tuvieron una mayor concentración de trehalosa respecto a las líneas transformadas. Los resultados obtenidos en otros trabajos similares han mostrado diferencias entre sí. Por ejemplo, Jang y colaboradores (2003) reportaron una mayor concentración de trehalosa en las plantas de arroz transformadas con el gen bifuncional *TPSP*, pero la cantidad de trehalosa no tuvo correlación con la expresión del gen. La misma transformación en las plantas de tomate de Lyu y colaboradores (2013) también generó plantas con tres veces más trehalosa. Por otro lado, Pellny y colaboradores (2004) no encontraron diferencias significativas en el contenido de trehalosa entre las plantas que sobreexpresaban la TPS y TPP y las plantas no transformadas.

8.7 Recuperación de las Plantas de Trigo al Estrés por Sequía

Después de someter a las plantas de trigo al tratamiento de sequía durante ocho días, se reanudó el riego y se evaluó su recuperación del estrés. Todas las plantas que fueron sometidas al tratamiento de sequía se recuperaron del estrés y continuaron su desarrollo. Los datos registrados sobre el desarrollo de las espigas de las plantas de trigo se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5. Tiempo y porcentajes de formación de espigas e inflorescencias de las líneas de plantas de trigo.

Línea	Semana post-germinación	
	10	12
	Plantas con primera espiga (%)	Espigas con inflorescencias (%)
NT	50	90
35S	0	14
RD1B	54	89
RD1C	80	100

La formación de espigas comenzó a la décima semana post-germinación en las plantas NT y en las líneas RD1B y RD1C (Tabla 5). De forma similar a lo sucedido en la etapa de germinación de las semillas, las plantas de la línea 35S también mostraron un retraso en el tiempo de espigamiento (Tabla 5). A diferencia de las plantas NT y de las líneas transformadas con el promotor rd29A, en las plantas 35S el proceso de formación de espigas inició hasta la semana once, donde incluso se registró un menor porcentaje de plantas espigadas, ya que solo el 14% de las plantas tenía las anteras visibles (Tabla 5). Después de la formación de las espigas, otra de las etapas fisiológicas más importantes del trigo es el desarrollo de inflorescencias, que son las estructuras donde se genera el polen requerido para la polinización de las plantas y, por lo tanto, al llenado de grano. La aparición de inflorescencias en las plantas de trigo sometidas al tratamiento de sequía ocurrió en la doceava semana post-germinación, dos semanas después de que las plantas desarrollaron la primera espiga (Tabla 5). Para este tiempo, la mayoría de las espigas de las líneas NT y RD1B habían generado inflorescencias, mientras que para las plantas RD1C el 100% de las espigas ya contaba con dichas estructuras y fue la única que había comenzado el desarrollo de una segunda espiga. Las espigas de las plantas transformadas 35S tuvieron un desarrollo más lento, pues las inflorescencias estaban presentes solo en un 14% de estas (correspondientes a las únicas espigas que se habían formado en la semana once).

A lo largo del desarrollo de las plantas de trigo en este trabajo, las plantas transformadas 35S mostraron diferencias notables en su desarrollo y morfología respecto a las plantas NT y las otras líneas transformadas. Por otro lado, en las líneas transformadas RD1B y RD1C, aunque la germinación total tardó 24 h más que en las plantas NT, también germinó el 100% de las semillas. Las diferencias entre las líneas RD1B y RD1C se observaron en las siguientes etapas de desarrollo de las plantas. Las plantas RD1B generaron la segunda hoja antes que las otras líneas, pero la morfología de sus hojas fue muy similar a las de las plantas NT. Por su parte, las plantas RD1C formaron más macollos y hojas más grandes. La baja actividad de FBPasa en la línea 35S podría explicar el retraso en la germinación y menor viabilidad de las semillas, así como la generación de hojas más delgadas y la formación de espiga tardía, ya que esta enzima está relacionada con la regeneración de RuBP y con la acumulación de almidón en el cloroplasto (Kobmann et al., 1994). Por lo contrario, el mantenimiento de la actividad de FBPasa en las líneas RD1B y RD1C permitió una mayor síntesis de almidón, generando así plantas con un mayor crecimiento. Además, en la línea RD1C la actividad de Rubisco fue más alta respecto a las otras plantas de trigo, lo que también pudo influir en la generación de un mayor número de espigas en un tiempo más corto. Aunque cuentan con el mismo promotor, las líneas RD1B y RD1C provienen de dos callos de trigo distintos, por lo que es probable que la inserción del gen *ScTPS1-TPS2* ocurrió en lugares distintos del genoma en cada una de ellas. El promotor *rd29A* permite que el gen bifuncional se exprese en condiciones de estrés abiótico, por lo que las diferencias en la respuesta de ambas líneas a la sequía se explicarían por las diferencias en la expresión del gen bifuncional.

El almidón es el carbohidrato de reserva en las plantas y es acumulado en los cloroplastos durante el día, cuando la fotosíntesis es más activa. En la noche, al no haber fotosíntesis, las plantas degradan el almidón para formar sacarosa y generar ATP mediante la respiración celular. Además de esta relación entre la síntesis de sacarosa a partir de las reservas de almidón, en los últimos años, se ha demostrado que el metabolismo de la trehalosa juega un papel importante en la regulación de los niveles de sacarosa en las plantas (Lawlor y Paul, 2014; Figueroa y Lunn, 2016).

La importancia del metabolismo de trehalosa en la regulación de otros azúcares está dada por la T6P, producto de la enzima TPS. La T6P actúa como una molécula señal frente a

aumentos en la concentración de sacarosa ya sea disminuyendo la síntesis de sacarosa, o promoviendo su degradación (Paul et al., 2008; Lawlor y Paul, 2014). Se ha propuesto también que la T6P puede regular además la activación de las enzimas de síntesis de almidón (Lunn et al., 2014).

La enzima bifuncional TPS-TPP fue diseñada para promover la síntesis de trehalosa sin provocar aumentos en la concentración de T6P (Miranda et al., 2007). Sin embargo, es posible que al sobreexpresar esta enzima de forma constitutiva, la constante actividad de la fosfatasa en la línea 35S también altere el equilibrio en los niveles de la T6P, afectando el contenido de almidón en plantas de una forma similar a las plantas que sobreexpresan solo la TPP. Por ejemplo, Kolbe y colaboradores (2005) reportaron que la sobreexpresión del gen *otsB* de *E. coli* (TPP) en plantas de *A. thaliana*, generó plantas con un menor estado de activación de la ADP-glucosa pirofosforilasa, enzima clave en la vía de síntesis de almidón. Por otro lado, Yadav y colaboradores (2014) encontraron que las plantas con la misma transformación no tuvieron diferencias en su contenido de T6P respecto a las plantas nativas, pero sí una menor acumulación de sacarosa.

9. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS

En las plantas de trigo estudiadas en este trabajo, las líneas transformadas con el gen bifuncional *ScTPS1-TPS2*, mantuvieron la fotosíntesis de forma más eficiente durante la sequía que las plantas de trigo no transformadas. Esto, en concordancia con lo reportado en la bibliografía (Jang et al., 2003; Lee et al., 2003; Pellny et al., 2004; Cortina y Culiàñez-Macia, 2005; Lyu et al., 2012).

De manera interesante, los resultados encontrados en este trabajo muestran que existen diferencias en la respuesta de la fotosíntesis de las plantas de trigo cuando el aumento de la síntesis de trehalosa ocurre de forma constitutiva y cuando esta ocurre en periodos de estrés. El análisis de las enzimas y metabolitos que participan en el ciclo de Calvin mostró que estas diferencias se deben al cambio en el metabolismo de azúcares causado por la modificación del metabolismo de trehalosa en las plantas de trigo.

En las plantas de la línea 35S, la expresión constitutiva de la enzima bifuncional TPS-TPP causó diferencias en su morfología y metabolismo. Las plantas 35S tuvieron el porcentaje de germinación más bajo, así como un crecimiento retardado y un menor tamaño de hoja. La actividad de FBPasa fue más baja en la línea 35S que en las RD1B y RD1C durante la mayor parte del tratamiento (Fig. 9), por lo que las diferencias en el crecimiento de las plantas 35S podrían atribuirse a que hubo una menor acumulación de almidón. A su vez, esto indicaría que en la línea 35S el flujo de triosas fosfato fue dirigido mayormente hacia el citoplasma (Fig. 12).

Las variaciones en la actividad de SPS a lo largo de los días (Fig. 10), podrían deberse a la competencia entre las enzimas SPS y TPS-TPP por la glucosa-6-fosfato (formada a partir de las triosas fosfato) en el citoplasma. Pero, con base a los resultados de la concentración de azúcares (Fig. 11), la síntesis de trehalosa se vio favorecida frente a la de sacarosa en la línea 35S como consecuencia de la expresión constitutiva del gen bifuncional *ScTPS1-TPS2* (Fig. 12).

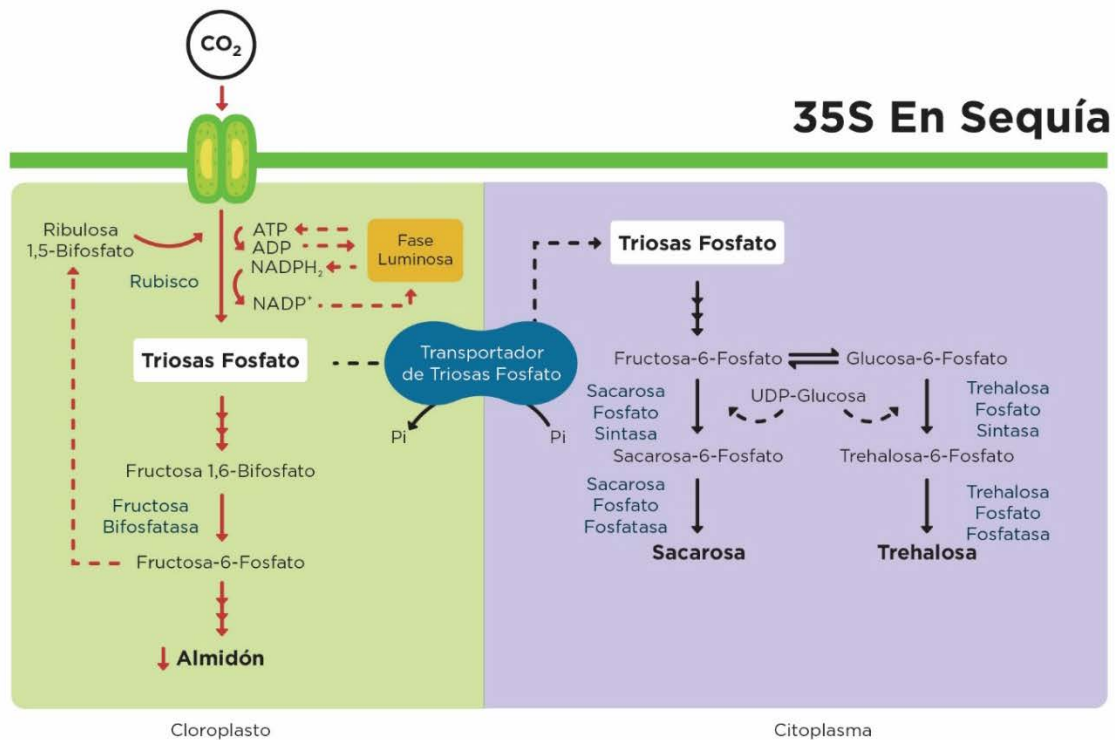
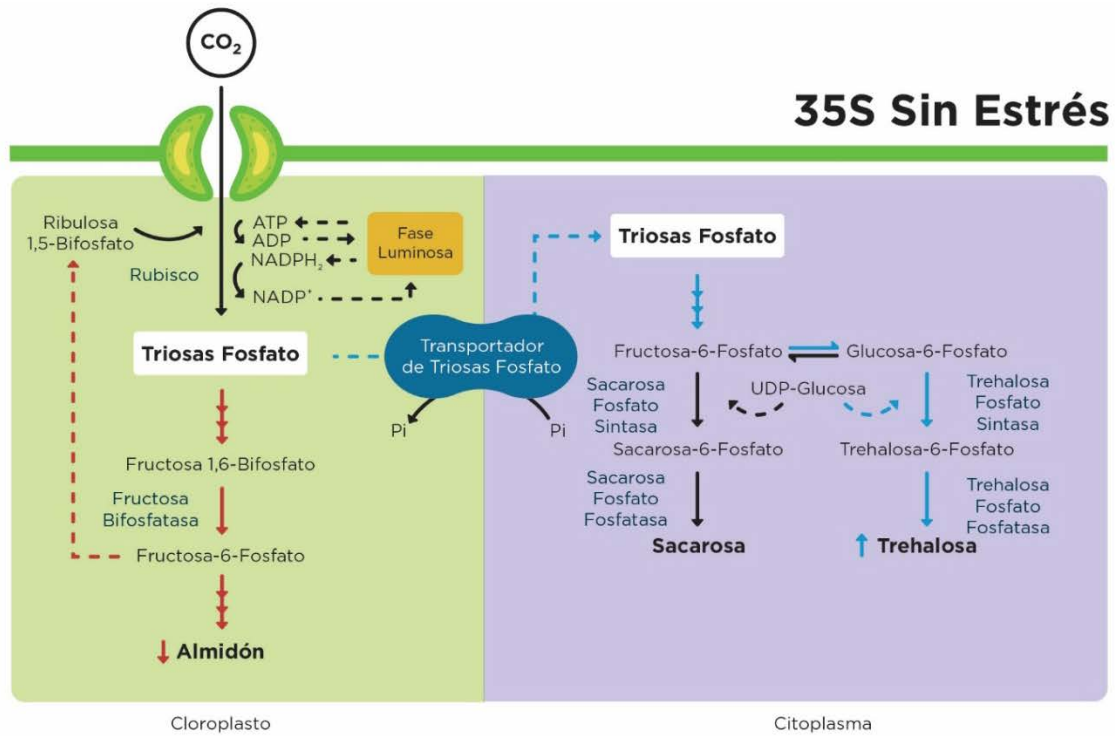
Al ser sometidas al tratamiento de sequía, a pesar de que la Rubisco mantuvo su actividad, las plantas 35S disminuyeron la tasa fotosintética debido a que el cierre estomático interfirió con la asimilación de CO₂ (Fig. 12). Esto, en conjunto con la baja concentración

de clorofila y la disminución en el transporte de electrones de la fase luminosa, provocó un descenso en la actividad fotosintética (Fig. 12).

Por su parte, en las líneas de plantas transformadas RD1B y RD1C, el proceso de germinación no se vio afectado. La tasa fotosintética en las plantas RD1B y RD1C sin estrés fue más alta y, a diferencia de las plantas 35S, las triosas fosfato se dirigieron mayormente a la continuación del ciclo de Calvin y/o a la síntesis de almidón, lo que explicaría las hojas más grandes y mayor número de macollos que tuvieron estas líneas (Fig. 13).

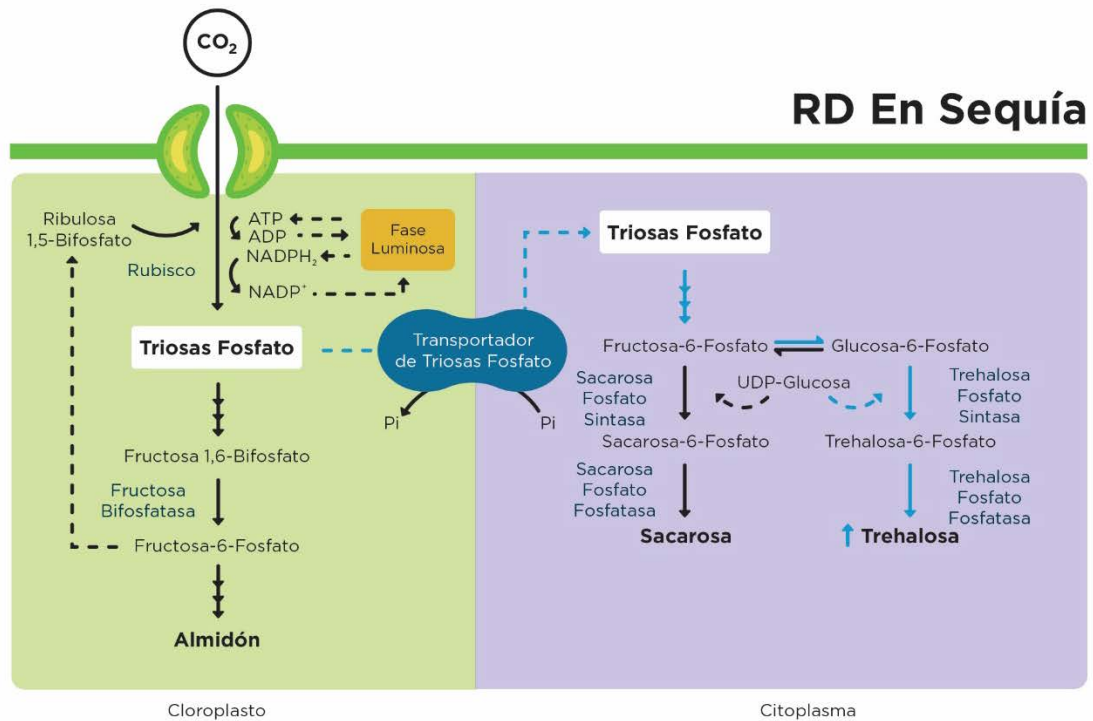
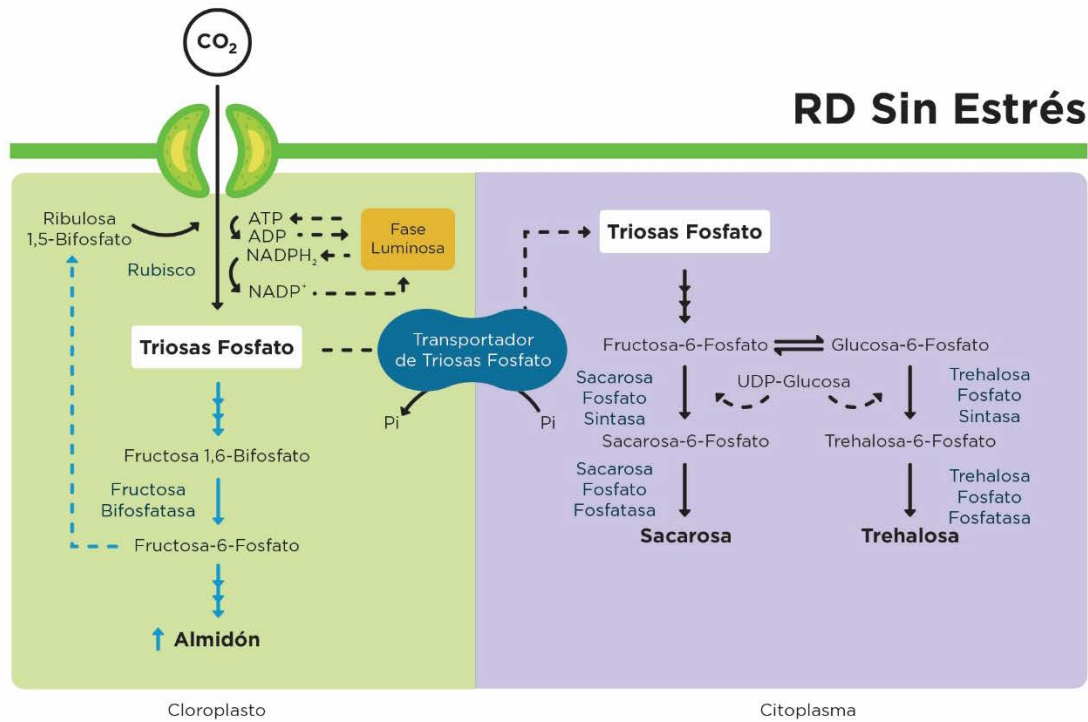
En condiciones de sequía, las plantas RD1B y RD1C mantuvieron la apertura estomática, por lo que continuó la fijación de CO₂ por la Rubisco (Fig. 13). Además, ambas líneas conservaron mejor el transporte de electrones de la fase luminosa respecto a las plantas NT y 35S (Fig. 13). La expresión del gen *ScTPS1-TPS2* bajo el promotor rd29A provocó un aumento en la concentración de trehalosa en las líneas RD1B y RD1C durante la sequía, sin embargo, debido a la eficiencia de la Rubisco, la regeneración de RuBP no se vio afectada (Fig. 13).

De manera general, este trabajo aporta evidencia de la importancia que la trehalosa ejerce, no solo en la tolerancia al estrés abiótico, sino también en la regulación del flujo de carbono y el metabolismo de azúcares en las plantas. Mientras que la síntesis constitutiva de trehalosa puede afectar el desarrollo vegetal, aumentos en la síntesis de trehalosa bajo condiciones de estrés por sequía permite el mantenimiento de una fotosíntesis eficiente sin afectar su desarrollo.



Disminución Aumento

Figura 12. Cambios en el ciclo de Calvin en las plantas de trigo transformadas con el promotor de expresión constitutiva (35S).



Disminución Aumento

Figura 13. Cambios en el ciclo de Calvin en las plantas de trigo transformadas con el promotor de respuesta a estrés (rd29A).

10. CONCLUSIÓN

La transformación genética de plantas de trigo con el gen bifuncional *ScTPS1-TPS2* mejoró la fotosíntesis en las plantas bajo condiciones de estrés por sequía, favoreciendo la eficiencia del ciclo de Calvin debido al mantenimiento de la actividad de las enzimas Rubisco y fructosa 1,6-bisfosfatasa, así como en la exportación de triosas fosfato para la síntesis de sacarosa y trehalosa.

11. PERSPECTIVAS

El proceso fotosintético es de gran complejidad, ya que implica una serie de reacciones relacionadas entre sí que, a su vez, son reguladas por factores ambientales, tales como la disponibilidad de agua, luz y temperatura. Además, factores internos como el metabolismo de la planta, influyen en la eficiencia de la fotosíntesis.

En el presente trabajo se estudió cómo fue afectado el ciclo de Calvin en plantas transformadas para aumentar su síntesis de trehalosa. Una de las limitaciones de este estudio fue el no poder conocer el efecto del tratamiento de sequía sobre la producción de biomasa de las plantas de trigo. Este resultado brindaría información importante, ya que la generación de grano es el producto final del ciclo de vida de esta planta y está directamente relacionado con la fijación de carbono y síntesis de azúcares. Asimismo, la determinación de la actividad de enzimas relacionadas con la síntesis de almidón o la cuantificación de este permitiría ampliar la información respecto a la acumulación de biomasa y de cómo el metabolismo de carbohidratos es afectado por la transformación con el gen *ScTPS1-TPS2* de las plantas de trigo.

Los datos encontrados indican que la respuesta de las plantas de trigo fue diferente entre las líneas transformadas, incluso entre las dos líneas transformadas con el promotor *rd29A*. A pesar de tener el mismo promotor, las líneas RD1B y RD1C mostraron diferencias en su respuesta al estrés por sequía, por lo que la evaluación de la expresión génica ayudaría a comprender las diferencias existentes entre ambas líneas. De la misma manera, la cuantificación de T6P, metabolito crucial en la regulación del metabolismo de azúcares, permitiría comparar el efecto de la expresión constitutiva y la expresión en respuesta a estrés abiótico del gen bifuncional *ScTPS1-TPS2* sobre las plantas de trigo en sus diferentes etapas de crecimiento.

12. REFERENCIAS

- Abebe T., Guenzi A. C., Martin, B, Cushman J. C. (2003). Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol.* 131(4):1748–55.
- Anjum S., Xie X., Wang L. (2011). Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *Afr. J. Agric. Res.* 6(9):2026–2032.
- Ashraf M., Harris P. J. C. (2013). Photosynthesis under stressful environments: An overview. *Photosynthetica.* 51(2):163–190.
- Balla K., Bencze S., Bónis P., Árendás T., Veisz O. (2014). Changes in the photosynthetic efficiency of winter wheat in response to abiotic stress. *Open Life Sci.* 9(5):519–530.
- Barickman T. C., Kopsell D. A., Sams C. E. (2014). Absciscic acid increases carotenoid and chlorophyll concentrations in leaves and fruit of two tomato genotypes. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 139(3):261–266.
- Basurto M., Núñez A., Pérez R., Hernández O. A. (2008). Fisiología del estrés ambiental en plantas. *Synthesis.* 1–5.
- Bell W., Sun W., Hohmann S., Wera S., Reinders A. (1998). Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J. Biol. Chem.* 273:11–19.
- Bota J., Medrano H., Flexas J. (2004). Is photosynthesis limited by decreased Rubisco activity and RuBP content under progressive water stress? *New Phytol.* 162(3):671–681.
- Bowne J. B., Erwin T. A., Juttner J., Schnurbusch T., Langridge P. (2012). Drought Responses of Leaf Tissues from Wheat Cultivars of Differing Drought Tolerance at the Metabolite Level. *Molecular Plant.* 5(2):418–429.
- Bradford M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1–2):248–254.
- Cabral-Torres, F. A. (2014). Respuesta fenotípica de plantas de trigo transformadas con el gen *ScTPS1-TPS2* para síntesis de trehalosa (tesis de Maestría). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México.
- Chakraborty U., Pradhan B. (2012). Oxidative stress in five wheat varieties (*Triticum aestivum* L.) exposed to water stress and study of their antioxidant enzyme defense system, water stress responsive metabolites and H₂O₂ accumulation. *Braz. J. Plant Physiol.* 24(2):117–130.
- Chang B., Yang L., Cong W., Zu Y., Tang Z. (2014). The improved resistance to high salinity induced by trehalose is associated with ionic regulation and osmotic adjustment in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol. Biochem.* 77:140–148.

- Chaves M. M., Flexas J., Pinheiro C. (2009). Photosynthesis under drought and salt stress: Regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of Botany*. 103(4):551–560.
- Cortina C., Culiáñez-Macià F. A. (2005). Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Sci*. 169(1):75–82.
- De Ronde J. A., Cress W. A., Krüger G. H. J., Strasser R. J., Van Staden J. (2004). Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an Arabidopsis P5CR gene, during heat and drought stress. *J. Plant Physiol*. 161(11):1211–1224.
- Dinakar C., Djilianov D., Bartels D. (2012). Photosynthesis in desiccation tolerant plants: Energy metabolism and antioxidative stress defense. *Plant Sci*. 182(1):29–41.
- Ding F., Wang M., Zhang S., Ai X. (2016). Changes in SBPase activity influence photosynthetic capacity, growth, and tolerance to chilling stress in transgenic tomato plants. *Sci. Rep.* (6):1–14.
- Dwivedi S. K., Arora A., Singh V. P., Singh G. P. (2017). Induction of water deficit tolerance in wheat due to exogenous application of plant growth regulators: membrane stability, water relations and photosynthesis. *Photosynthetica*. 55:1–9.
- El-Bashiti T., Hamamci H., Öktem H. A., Yücel M. (2005). Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. *Plant Sci*. 169(1):47–54.
- Feller U. (2016). Drought stress and carbon assimilation in a warming climate: Reversible and irreversible impacts. *J. Plant Physiol*. 203:84–94.
- Figueroa C. M., Lunn J. E. (2016). A Tale of Two Sugars: Trehalose 6-Phosphate and Sucrose. *Plant Physiol*. 172(1):7–27.
- Finkelstein R. (2013). Absciscic Acid Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book*, 11:e0166.
- Flexas J., Bota J., Loreto F. (2004). Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biol*. 6:269–279.
- Flexas J., Diaz-Espejo A., Conesa M. A., Coopman R. E., Douthe C., Gago J., Gallé A., Galmés J., Medrano H., Ribas-Carbo M., Tomàs M., Niinemets Ü. (2016). Mesophyll conductance to CO₂ and Rubisco as targets for improving intrinsic water use efficiency in C3 plants. *Plant Cell Environ*. 39(5):965–982.
- Galmés J., Conesa M. A., Díaz-Espejo A., Mir A., Perdomo J. A., Niinemets Ü., Flexas J. (2014). Rubisco catalytic properties optimised for present and future climatic conditions. *Plant Sci*. 226:61–70.
- García-Murria M. J. (2006). Regulación redox de la Rubisco: contribución estructural y funcional del par de residuos conservados Cys172 y Cys192 (tesis de Doctorado) Universitat de Valencia. Valencia, España.
- Garg A., Kim J., Owens T. G., Ranwala A. P., Choi Y. D., Kochian L. V., Wu R. J. (2002). Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *PNAS*. 99(25):15898–15903.

- Gill S. S., Khan N., Tuteja N. (2011). Differential cadmium stress tolerance in five indian mustard (*Brassica juncea* L.) cultivars: an evaluation of the role of antioxidant machinery. *Plant Signal Behav.* 6(2):293–300.
- Gupta S., Agarwal V. P., Gupta N. K. (2012). Efficacy of putrescine and benzyladenine on photosynthesis and productivity in relation to drought tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *PMBP.* 18(4):331–336.
- Habash D. Z., Baudo M., Hindle M., Powers S. J., Defoin-Platel M., Mitchell R., Saqi M., Rawlings C., Latiri K., Araus J.L., Abdulkader A., Tuberosa R., Lawlor D., Nachit M. M. (2014). Systems responses to progressive water stress in durum wheat. *PLoS ONE*, 9(9).
- Hansen H., Dörffling K. (1999). Changes of free and conjugated abscisic acid and phaseic acid in xylem sap of drought-stressed sunflower plants. *J. Exp. Bot.* 50(339):1599–1605.
- Huber S. C. (1981). Interspecific Variation in Activity and Regulation of Leaf Sucrose Phosphate Synthetase. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 102:443–450.
- Ingram J., Chandler J. W., Gallagher L., Salamini F., Bartels D. (1997). Analysis of cDNA clones encoding sucrose-phosphate synthase in relation to sugar interconversions associated with dehydration in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum* Hochst. *Plant Physiol.* 115(1):113–121.
- IPCC. (2013). Summary for Policymakers. *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change.* Suiza.
- Jain N. K., Roy I. (2009). Effect of trehalose on protein structure. *Protein Sci.* 18(1):24–36.
- Jang I. C., Oh S. J., Seo J. S., Choi W. B., Song S. I., Kim C. H., Kim Y.S., Seo H.S., Choi Y.D., Nahm B.H., Kim J.K. (2003). Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiol.* 131(2), 516–524.
- Juárez Z. N., Bárcenas-Pozos M. E., Hernández L. R. (2014). El grano de trigo: características generales y algunas problemáticas y soluciones a su almacenamiento. *Temas Selectos de Ingeniería En Alimentos.* 8: 79–93.
- Kobmann J., Sonnewald U., Willmitzer L. (1994). Reduction of the chloroplastic fructose-1,6- bisphosphatase in transgenic potato plants impairs photosynthesis and plant growth. *Plant J.* 6(5):637–650.
- Kolbe A., Tiessen A., Schluepmann H., Paul M., Ulrich S., Geigenberger P. (2005). Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis via posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *PNAS.* 102(31):11118–11123.
- Kranner I., Birti S. (2005). A Modulating Role for Antioxidants in Desiccation Tolerance 1. *Integr. Comp. Biol.* 45:734–740.

- Kumar S., Dhingra A., Daniell H. (2004). Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiol.* 136(1):2843–2854.
- Lawlor D. W., Paul M. J. (2014). Source/sink interactions underpin crop yield: the case for trehalose 6-phosphate/SnRK1 in improvement of wheat. *Front. Plant Sci.* 5:1–14.
- Lee S. B., Kwon H. Bin, Kwon S. J., Park S. C., Jeong M. J., Han, S. E., Byun M.O., Daniell H. (2003). Accumulation of trehalose within transgenic chloroplasts confers drought tolerance. *Mol. Breed.* 11(1):1–13.
- Li H., Ahammed G. J., Zhou G., Xia X., Zhou J., Shi K. (2016). Unraveling Main Limiting Sites of Photosynthesis under Below- and Above-Ground Heat Stress in Cucumber and the Alleviatory Role of Luffa Rootstock. *Front. Plant Sci.* 7:1–15.
- Lichtenhalter H. K. (1987). Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology.* 148:350–382.
- Lu C., Zhang J. (1999). Effects of water stress on photosystem II photochemistry and its thermostability in wheat plants. *J. Exp. Bot.* 50(336):1199–1206.
- Lunn J. E., Delorge I., Figueroa C. M., Van Dijck P., Stitt M. (2014). Trehalose metabolism in plants. *Plant J.* 79(4): 544-567.
- Lyu J., Il Min S. R., Lee J. H., Lim Y. H., Kim J. K., Bae C. H., Liu J. R. (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 Organ Cult.* 112(2):257–262.
- Lyu J. I., Min S. R., Lee J. H., Lim Y. H., Kim J. K., Bae C. H., Liu J. R. (2013). Overexpression of a trehalose-6-phosphate syntase/phosphatase fusion gene enhances tolerance and photosynthesis during drought and salt stress without growth aberrations in tomato. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 112(1):257-262.
- Makino A. (2011). Photosynthesis, grain yield, and nitrogen utilization in rice and wheat. *Plant Physiol.* 155:125–129.
- Marquez Berber S. R., Almaguer Vargas G., Schwentesius Rindermann R., Ayala Garay A. V. (2014). Trigo en Sonora y su contexto nacional e internacional. Centro de Estudios para el Desarrollo Rural y Sustentable y la Soberanía Alimentaria. Ciudad de México, México. 212 pp.
- Medrano H., Escalona J. M., Bota J., Gulías J., Flexas J. (2002). Regulation of photosynthesis of C3 plants in response to progressive drought: Stomatal conductance as a reference parameter. *Annals of Botany,* 89:895–905.
- Medrano, H., Pou, A., Thomas, M., Martorell, S., Gulias, J., Flexas, J., & Escalona, J. M. (2012). Average daily light interception determines leaf water use efficiency among different canopy locations in grapevine. *Agricultural Water Management,* 114, 4–10.
- Miralles D. J., Gonzáles F. G., Abeledo L. G., Serrago R. A., Alzueta I., García G. A., De San Caledonio R.P., Lo Valvo P. (2014). Manual de trigo y cebada para el cono sur:

procesos fisiológicos y bases de manejo. Primera edición. Buenos Aires, Argentina. 56 pp.

- Miranda J. A., Avonce N., Suárez R., Thevelein J. M., Van Dijck P., Iturriaga G. (2007). A bifunctional TPS–TPP enzyme from yeast confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*. 226(6):1411–1421.
- Mishra D., Shekhar S., Agrawal L., Chakraborty S., Chakraborty N. (2017). Cultivar-specific high temperature stress responses in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) associated with physicochemical traits and defense pathways. *Food Chem.* 221:1077–1087.
- Mishra K. B., Iannacone R., Petrozza A., Mishra A., Armentano N., La Vecchia G., Trtílek M., Cellini F., Nedbal L. (2012). Engineered drought tolerance in tomato plants is reflected in chlorophyll fluorescence emission. *Plant Sci.* 182(1):79–86.
- Moghiaieb R., Tanaka N., Saneoka H., Hussein H. A., Yousef S. S., Ewada M. A. F., Aly M.A.M., Fujita K. (2000). Expression of betaine aldehyde dehydrogenase gene in transgenic tomato hairy roots leads to the accumulation of glycine betaine and contributes to the maintenance of the osmotic potential under salt stress. *Soil Sci. Plant Nutr.* 46(4):873–883.
- Parry A. D., Horgan R. (1991). Carotenoids and abscisic acid (ABA) biosynthesis in higher plants. *Physiol. Plant.* 82(2):320–326.
- Parry M. A. J., Reynolds M., Salvucci M. E., Raines C., Andralojc P. J., Zhu X. G., Price G.D., Condon A.G., Furbank R. T. (2011). Raising yield potential of wheat. II. Increasing photosynthetic capacity and efficiency. *J. Exp. Bot.* 62(2):453–467.
- Paul M. J., Gonzalez-Uriarte A., Griffiths C. A., Hassani-Pak K. (2018). The role of trehalose 6-phosphate in crop yield and resilience. *Plant Physiol.* 177(1): 12-23.
- Paul M. J., Primavesi L. F., Jhurrea D., Zhang Y. (2008). Trehalose Metabolism and Signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 18(59):417–441.
- Pellny T. K., Ghannoum O., Conroy J. P., Schluepmann H., Smeekens S., Andralojc J., Krause K.P., Goddijn O., Paul, M. J. (2004). Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. *Plant Biotechnol. J.* 2(1):71–82.
- Pereira C. S., Lins R. D., Chandrasekhar I., Freitas L. C. G., Hünenberger P. H. (2004). Interaction of the Disaccharide Trehalose with a Phospholipid Bilayer: A Molecular Dynamics Study. *Biophys. J.* 86(4):2273–2285.
- Pizzio G. A., Rodriguez L., Antoni R., Gonzalez-Guzman M., Yunta C., Merilo E., Kollist H., Albert A., Rodriguez, P. L. (2013). The PYL4 A194T mutant uncovers a key role of PYR1-LIKE4/PROTEIN PHOSPHATASE 2CA interaction for abscisic acid signaling and plant drought resistance. *Plant Physiol.* 163(1), 441–55.
- Ramanjulu S., Bartels D. (2002). Drought-and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant Cell Environ.* 25:141–151.

- Romero-Reyes, A. (2016). Estudio del efecto de la transformación de plantas de trigo (*T. aestivum*) sobre su capacidad fotosintética (tesis de Licenciatura). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo, Sonora, México.
- Shangguan Z., Shao M., Dyckmans J. (1999). Interaction of Osmotic Adjustment and Photosynthesis in Winter Wheat Under Soil Drought. *J. Plant Physiol.* 154:753–758.
- Sharkey T. D., Bernacchi C. J., Farquhar G. D., Singsaas E. L. (2007). Fitting photosynthetic carbon dioxide response curves for C3 leaves. *Plant Cell Environ.* 30(9):1035–1040.
- Sharma D. K., Andersen S. B., Ottosen C. O., Rosenqvist E. (2015). Wheat cultivars selected for high Fv/Fm under heat stress maintain high photosynthesis, total chlorophyll, stomatal conductance, transpiration and dry matter. *Physiol. Plantarum.* 153(2):284–298.
- Simkin A. J., McAusland L., Headland L. R., Lawson T., Raines C. A. (2015). Multigene manipulation of photosynthetic carbon assimilation increases CO₂ fixation and biomass yield in tobacco. *J. Exp. Bot.* 66(13):4075–90.
- Singer M., Lindquist S. (1998). Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol.* 16(11):460–468.
- Sivakumar P., Sharmila P., Jain V., Pardha Saradhi P. (2002). Sugars have potential to curtail oxygenase activity of Rubisco. *Biochem. Biophys. Res. Co.* 298(2):247–250.
- Slavik B. (1974). Methods of studying plant water relation. Academy Publishing House. The Czechoslovak Academy of Science, 146.
- Suárez R., Calderón C., Iturriaga G. (2009). Enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic alfalfa accumulating trehalose. *Crop Sci.* 49(5):1791–1799.
- Taiz L., Zeiger E. (2010). Plant Physiology. *Annals of Botany*. Sinauer Associates. Third edition. 690 pp.
- Valenzuela-Avendaño, J. P. (2012). Análisis de vías metabólicas en trigo transformado con los genes para síntesis de trehalosa (tesis de Doctorado). Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Hermosillo, Sonora, México.
- Valenzuela-Avendaño J., Valenzuela-Soto E. (2009). Trehalosa: el azúcar de la resurrección. *Ciencia y Desarrollo.* (35):58–65.
- Vijayalakshmi K., Fritz A. K., Paulsen G. M., Bai G., Pandravada S., Gill B. S. (2010). Modeling and mapping QTL for senescence-related traits in winter wheat under high temperature. *Mol. Breed.* 26(2):163–175.
- Yadav U. P., Ivakov A., Feil R., Duan G. Y., Walther D., Giavalisco P., Piques M., Carillo P., Hubberten H.M., Stitt M., Lunn, J. E. (2014). The sucrose-trehalose 6-phosphate (Tre6P) nexus: Specificity and mechanisms of sucrose signalling by. *J. Exp. Bot.* 65(4):1051–1068.
- Yellisetty V., Reddy L. A., Mandapaka M. (2015). In planta transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using TPS1 gene for enhancing tolerance to abiotic stresses. *J. Gen.* 94(3):425–434.

- Yeo E. T., Kwon H. B., Han S. E., Lee J. T., Ryu J. C., Byu M. O. (2000). Genetic engineering of drought resistant potato plants by introduction of the trehalose-6-phosphate synthase (TPS1) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cells.* 10(3):263–268.
- Zhang L. T., Zhang Z. S., Gao H. Y., Xue Z. C., Yang C., Meng X. L., Meng Q. W. (2011). Mitochondrial alternative oxidase pathway protects plants against photoinhibition by alleviating inhibition of the repair of photodamaged PSII through preventing formation of reactive oxygen species in *Rumex K-1* leaves. *Physiol. Plantarum.* 143(4):396–407.
- Zimmermann G., Kelly G. J., Latzko E. (1976). Efficient Purification and Molecular Properties of Spinach Chloroplast Fructose 1,6-Biphosphatase. *Eur. J. Biochem.* 70:361–367.
- Zingaretti S. M., Inacio M. C., Pereira L., Antunez Paz T., Franca S. (2013). Water Stress and Agriculture. Responses of Organisms to Water Stress. *INTECH*:151-179.

ANEXOS



Anexo 1. Plantas de trigo de las diferentes líneas a las 3 semanas post-germinación.