

UNIVERSIDAD DE SONORA

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

**Estudio del efecto de la transformación de plantas de
trigo (*T. aestivum*) con el gen para síntesis de trehalosa
en su capacidad fotosintética**

TESIS PROFESIONAL PRÁCTICA

Que para obtener el Título de

QUÍMICO EN ALIMENTOS

Presenta:

Andrea Romero Reyes

Repositorio Institucional UNISON



**“El saber de mis hijos
hará mi grandeza”**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como
openAccess

CARTA DE APROBACIÓN

Los miembros del jurado designado para revisar la Tesis Profesional de Andrea Romero Reyes, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el Título de Químico en Alimentos.

Dra. Elisa Miriam Valenzuela Soto
Presidente

M.C. María Guadalupe Cáñez Carrasco
Secretaria

Dr. Aldo Alejandro Arvizu Flores
Vocal

Dr. Alonso Alexis López Zavala
Suplente

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

Gracias a la Universidad de Sonora por brindarme el espacio y las herramientas para mi formación como profesionista, así como al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. por permitirme desarrollar mis habilidades e iniciar mi camino en la investigación en sus espacios.

A la Dra. Elisa Valenzuela por abrirme las puertas de su laboratorio, darme la oportunidad de integrarme a su equipo de trabajo y contribuir a mi crecimiento científico y personal.

A la M.C. Ciria Figueroa por toda su paciencia, ánimos y por enseñarme todo lo que sé sobre el trabajo en un laboratorio de investigación.

A la M.C. Lupita Cárnez por todas las atenciones brindadas no solamente como parte de mi comité de tesis, sino durante toda la licenciatura en la Universidad.

Al Dr. Aldo Arvizu y al Dr. Alonso Alexis López por su apoyo y retroalimentación durante el desarrollo de este trabajo.

Dedico este trabajo a mi familia. A mis papás, muchas gracias por todo su apoyo y comprensión y siempre confiar en mí y permitirme llegar tan lejos; a mis hermanos, que aun siendo tan diferentes me han logrado entender todo este tiempo. A mi abuelo, porque lo mejor que me pudo dejar fue la motivación para prepararme y superarme a mí misma.

Gracias también a mis amigos. A Fátima, Mariam, Claudia y Melissa por todos estos años de amistad y todos los buenos momentos juntas. A Karla, Génesis, Martín, Saulo y César por todos los chistes, chismes y momentos divertidos. Obviamente a Yoko, por haber sido mi mejor amiga y haber sufrido conmigo todos estos años de la carrera y a los Mayokonesos, Héctor, Rafa y Julián, por ser el mejor equipo de laboratorio.

También a mis compañeros del laboratorio de Bioquímica de Proteínas de Estrés, Fernanda, Miguel y César por sus consejos y hacer mis días de trabajo en CIAD más amenos.

CONTENIDO

	Página
CARTA DE APROBACIÓN.....	2
AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS.....	3
RESUMEN.....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
OBJETIVOS.....	11
ANTECEDENTES.....	12
Trigo.....	12
Características del Trigo.....	12
Importancia del Trigo.....	13
Estrés por Sequía.....	14
Respuesta a estrés.....	16
Glicina betaína.....	16
Fotosíntesis.....	17
Fase luminosa.....	18
Clorofila.....	19
Fase oscura.....	20
Metabolismo de Azúcares.....	21
Hexocinasa.....	22
Trehalosa.....	23
Abundancia en la Naturaleza.....	24
Síntesis.....	24
Enzimas TPS y TPP.....	25
Función Osmoprotectora.....	25
Transformación de Cultivos para su Tolerancia a Estrés Hídrico.....	27
Transformación con el Gen para TPS.....	28
Efectos de la T6P.....	28
Transformación con la Enzima Bifuncional TPS-TPP.....	29

MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
Material Biológico.....	31
Esterilización de Semillas.....	31
Generación de Plantas.....	31
Inducción de Estrés por Sequía.....	31
Contenido Relativo de Agua	32
Determinación de Contenido de Clorofila a, b y total.....	32
Parámetros fotosintéticos.....	33
Obtención de Extractos.....	33
Determinación de Actividad de Hexocinasa.....	33
Determinación de Actividad de Trehalosa-6-fosfato Sintasa.....	33
Determinación de actividad de Trehalasa.....	34
Determinación de actividad de Betaína Aldehído Deshidrogenasa.....	34
Determinación de Proteína.....	35
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	36
Generación de Plantas.....	36
Contenido Relativo de Agua.....	37
Contenido de Clorofila a, b y total.....	39
Parámetros Fotosintéticos.....	42
Tasa de Asimilación de CO ₂	42
Eficiencia de la Asimilación de CO ₂	44
Eficiencia del Uso del Agua.....	45
Actividad de Hexocinasa.....	48
Actividad de Trehalosa-6-fosfato Sintasa.....	49
Actividad de Trehalasa.....	51
Actividad de Betaína Aldehído Deshidrogenasa.....	53
CONCLUSIONES.....	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1.	Principales productores de trigo en el año 2015.....	14
2.	Trabajos realizados sobre la transformación de plantas con genes para síntesis de trehalosa.....	28
3.	Porcentaje de germinación total de las diferentes líneas de plantas de trigo.....	36

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Etapas de desarrollo del trigo	13
2.	Fases e intermediarios de la fotosíntesis.....	18
3.	Estructura de la molécula de clorofila y las diferencias entre la clorofila a y b.....	20
4.	Síntesis de sacarosa y de almidón a partir del ciclo de Calvin	22
5.	Estructura de la molécula de trehalosa.....	23
6.	Vía TPS-TPP para síntesis de trehalosa.....	25
7.	Mecanismo de acción protectora de la molécula de trehalosa sobre las membranas celulares durante la desecación.....	26
8.	Mecanismo de acción protectora de la molécula de trehalosa sobre las proteínas durante la desecación.....	27
9.	Contenido relativo de agua de las diferentes líneas de plantas de trigo a lo largo del tratamiento de sequía.....	38
10.	Contenido de clorofila a de las diferentes líneas de plantas de trigo a lo largo del tratamiento de sequía.	39
11.	Contenido de clorofila b de las diferentes líneas de plantas de trigo a lo largo del tratamiento de sequía.....	40
12.	Contenido de clorofila total de las diferentes líneas de plantas de trigo a lo largo del tratamiento de sequía.....	41
13.	Tasa de asimilación de CO ₂ de las diferentes líneas de plantas de trigo durante el estrés por sequía.....	43
14.	Eficiencia de la asimilación del CO ₂ de las diferentes líneas de plantas de trigo durante el estrés por sequía.	45
15.	Eficiencia del uso del agua de las diferentes líneas de plantas de trigo durante el estrés por sequía.	47
16.	Actividad de hexocinasa en las diferentes líneas de plantas de trigo durante la sequía.....	49
17.	Actividad de TPS en las diferentes líneas de plantas de trigo durante la sequía.....	51
18.	Actividad de trehalasa en las diferentes líneas de plantas de trigo durante la sequía.....	53
19.	Actividad de BADH en las diferentes líneas de plantas de trigo durante la sequía...	55

RESUMEN

La trehalosa es un disacárido no reductor con la característica de ser una molécula estable a temperaturas altas y pH extremos, sintetizada principalmente mediante la vía metabólica TPS-TPP en bacterias, levaduras y plantas. En plantas de la resurrección como *Selaginella lepidophylla* la trehalosa tiene una función osmoprotectora, confiriéndole a estos organismos la capacidad de resistir largos períodos de desecación al sustituir la molécula de agua durante la deshidratación para proteger la estructura y función de las membranas y proteínas. Se insertó el gen *ScTPS1-TPS2* de *Saccharomyces cerevisiae*, que codifica para una enzima bifuncional para síntesis de trehalosa, en embriones de trigo (*Triticum aestivum*), generando plantas transgénicas con mayor resistencia a estrés por sequía. En este trabajo se evaluó el efecto de la transformación sobre la fotosíntesis y el metabolismo del carbono comparando la respuesta de las plantas transformadas de las líneas RD1A, RD1B y RD1C con plantas no transformadas (NT) sometidas a un tratamiento de estrés por sequía. Para medir el estado de hidratación de las plantas durante los días 0, 2, 4 y 8 del tratamiento se determinó el contenido relativo de agua (CRA). La eficiencia de la fotosíntesis se midió determinando los parámetros de intercambio gaseoso, eficiencia del uso del agua y el contenido de clorofila a, b y total. Se determinó la actividad de las enzimas trehalosa fosfato sintasa (TPS), hexocinasa y trehalasa para conocer el estado del metabolismo de carbohidratos así como betaína aldehído deshidrogenasa (BADH) para explorar la síntesis de osmolitos en respuesta al tratamiento. Las plantas transformadas mantuvieron un CRA más alto que las no transformadas a lo largo del estrés. No se encontraron efectos de la sequía sobre los niveles de clorofila. La tasa de asimilación y eficiencia en el uso de CO₂ de las plantas transformadas fue más eficiente durante la sequía en las plantas NT. Las plantas transformadas mantuvieron mejor su actividad de TPS, hexocinasa y trehalasa y tuvieron mayor actividad de BADH que las NT. Estos resultados sugieren que la transformación, además de otorgarle mayor resistencia a sequía también tuvo un impacto en la fotosíntesis y metabolismo de las plantas.

INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum*) es el cereal más cultivado a nivel mundial, ocupando una gran parte de la superficie destinada a agricultura. Se clasifica como una planta C3 por el tipo de fotosíntesis que lleva a cabo, junto a otros cereales como el arroz y la cebada.

La fotosíntesis es la vía metabólica mediante la cual las plantas sintetizan carbohidratos a partir del dióxido de carbono (CO_2) presente en la atmósfera, utilizando como sustratos agua y luz solar, formando oxígeno y glucosa como productos.

Este proceso ocurre mediante dos fases: la fase luminosa, donde las moléculas de clorofila captan la luz solar para transformarla en energía química y la fase oscura, donde se sintetizan azúcares mediante el proceso conocido como ciclo de Calvin-Benson, donde la enzima ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco) cataliza la fijación del CO_2 atmosférico al unirlo con la ribulosa-1,5-bisfosfato (RuBP), un azúcar de cinco átomos de carbono presente en el tejido vegetal, para sintetizar fructosa-1,6-bisfosfato, que es el metabolito a partir del cual las plantas pueden formar sacarosa, para transportar energía hacia otros tejidos, o almidón, para almacenarla.

Con frecuencia, los cultivos de trigo y de otros productos agrícolas se enfrentan a estrés abiótico, por ejemplo, altas temperaturas, sequía, salinidad del suelo, entre otros. De estos, la sequía es el tipo de estrés abiótico que más afecta el rendimiento de los cultivos y según las proyecciones a futuro, se espera que el cambio climático tenga un gran impacto en los perfiles de temperatura y precipitación en el mundo, lo que podría aumentar la incidencia de sequías a lo largo de las zonas agrícolas.

La sequía es una de las mayores limitantes para la productividad de muchos cultivos. Cuando una planta está en condiciones limitadas de agua, se observan diversos efectos, como un cierre de los estomas de las hojas para evitar la pérdida de agua, lo que disminuye la asimilación de CO_2 , reduciendo la tasa de fotosíntesis. Durante el estrés por sequía las plantas pueden tener diversas respuestas, como una alteración en los niveles hormonales, inducción o supresión de algunas vías metabólicas o cambios en la expresión de ciertos genes.

Además de lo anterior, una de las principales estrategias para enfrentar el estrés es la síntesis de compuestos que protegen a las células, ayudando a mantener su turgencia, así como la estructura de las membranas y proteínas. Ejemplos de estos compuestos son azúcares como la trehalosa, derivados alcohólicos de azúcares como el manitol, compuestos cuaternarios de amonio y sulfonio como la glicina betaína y el sulfopropionaldehído y aminoácidos como la prolina.

La trehalosa (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor, formado por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace glucosídico α - α -1-1, lo que la hace muy estable a altas temperaturas y a pH extremos. Este compuesto se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, pues se sabe que puede sintetizarse por diferentes organismos como bacterias, algas, levaduras, hongos, plantas e invertebrados.

Sin embargo, a pesar de que todas las plantas sintetizan trehalosa, solo algunas son capaces de almacenarla. Estas plantas son conocidas como “plantas de resurrección”, como *Selaginella lepidophylla* y *Myrothamnus flabellifolia*, las cuales obtienen su nombre debido a su capacidad de resistir períodos largos de desecación y recuperar su viabilidad una vez que son rehidratadas. Su capacidad de resistir largos periodos de deshidratación está relacionada con los niveles presentes de trehalosa, la cual actúa protegiendo proteínas y membranas al reemplazar a la molécula de agua, formando puentes de hidrógeno para unirse a las proteínas y mantener su estructura y función.

El papel de la trehalosa en la resistencia a desecación en plantas de la resurrección, ha despertado el interés de mejorar otras especies vegetales al otorgarles la capacidad de acumular este disacárido, lo que podría representar una mejora en su metabolismo del carbono y en su tolerancia a la sequía.

En este trabajo se estudió el efecto que tiene la transformación de plantas de trigo con un gen que codifica para una enzima bifuncional para síntesis de trehalosa, sobre su fotosíntesis y metabolismo del carbono medido tanto como eficiencia para fijar CO₂ como respecto a cambios en la actividad de enzimas que participan en este, en plantas transformadas y no transformadas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar la eficiencia de los parámetros fotosintéticos y del funcionamiento del metabolismo del carbono en plantas de trigo (*T. aestivum*) transformadas con el gen *ScTPS1-TPS2* para síntesis de trehalosa sometidas a estrés por sequía.

Objetivos Específicos

- Someter a plantas de trigo transformadas con el gen *ScTPS1-TPS2* y a plantas no transformadas a un tratamiento de sequía para someterlas a estrés.
- Conocer el estado de la fotosíntesis en las plantas transformadas y no transformadas midiendo sus parámetros de fotosíntesis y contenido de clorofila a, b y total durante los días de estrés por sequía.
- Estudiar el metabolismo de carbohidratos en las plantas transformadas y no transformadas determinando la actividad de las enzimas trehalosa fosfato sintasa, hexocinasa, trehalasa y betaína aldehído deshidrogenasa a lo largo del tratamiento de sequía.
- Comparar la respuesta al estrés por sequía de las plantas transformadas y de las no transformadas.

ANTECEDENTES

Trigo

El trigo (*T. aestivum*) fue uno de los primeros cultivos domesticados por la humanidad y, por más de 8000 años, ha sido la base de la alimentación para la mayoría de las civilizaciones de Europa, oeste de Asia y norte de África (CIMMYT, 2009). El trigo se destina para la obtención de una gran variedad de productos, como la harina, la sémola y la malta, los cuales a la vez se utilizan como materia prima para elaborar otros productos diferentes (Juárez y col., 2014). Actualmente, el trigo se produce en un amplio rango de ambientes climáticos y regiones geográficas (CIMMYT, 2009).

En México, se clasifica al grano de trigo de acuerdo con su funcionalidad como fuertes, medios fuertes, suaves y cristalinos, de los cuales en Sonora se producen los panaderos (fuertes y medio fuertes) y cristalinos (Juárez y col., 2014).

Características del Trigo

El trigo se clasifica como una planta tipo C3 por el tipo de fotosíntesis que realiza. La hoja bandera del trigo, que es la hoja donde se encuentra la espiga, tiene un papel primordial en el rendimiento del grano, pues es la principal fuente de fotosintatos durante la etapa del llenado del grano (Gutiérrez-Rodríguez y col., 2004; Raines, 2010). Las plantas de trigo crecen a una temperatura óptima de 10 a 25 °C, sin embargo, pueden llegar a crecer a temperaturas entre 3 y 33 °C. La humedad del suelo no debe ser menor al 30% (Juárez y col., 2014; Miralles y col., 2014).

El ciclo de crecimiento del trigo se da en una serie de seis etapas de desarrollo: establecimiento, pre-macollaje, macollaje, encañazón, antesis y llenado de grano (figura 1). Posteriormente, una vez que ocurre la formación del grano, continúa una etapa de secado del grano donde este pierde humedad (Miralles y col., 2014).

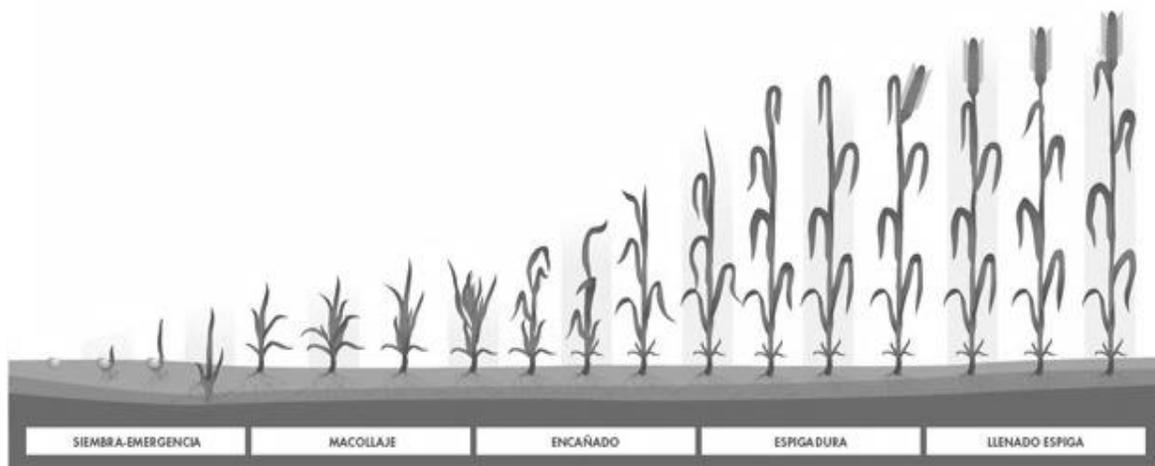


Figura 1. Etapas de desarrollo del trigo (Fuente: <http://www.sqm.com>)

Importancia del Trigo

El trigo ocupa un 30% del área total mundial utilizada para la producción de cereales, siendo el cultivo que crece en más superficies distintas, con más de 240 millones de hectáreas cultivadas en el mundo (CIMMYT, 2009; Cossani y Reynolds, 2012). Su producción anual excede los 0.6 billones de toneladas y su comercio es mayor que el de todos los otros cultivos combinados, por lo que también provee más alimento para consumo humano que cualquier otra fuente (CIMMYT, 2009). La producción de trigo obtenida durante el año 2015 se muestra en la tabla 1.

Se calcula que el trigo provee 500 kcal de energía alimenticia per cápita diaria en países como China e India, dos de los más poblados del mundo. Además, a lo largo de todos los países en desarrollo, un 16% de las calorías totales diarias proviene del trigo, mientras que en los países desarrollados es de un 26%, haciendo al trigo el segundo cereal más importante, solo después del arroz (CIMMYT, 2009).

Del año 1993 al año 2000, la población mundial tuvo un crecimiento del 1.5% mientras que la producción de trigo solamente creció 0.9%, por lo que, de continuar esta tendencia, uno de los mayores retos para las futuras generaciones será mantener el suministro de alimentos (CIMMYT, 2009).

En los países desarrollados, el 90% de la superficie destinada para trigo se riega mediante lluvia, mientras que en los países en desarrollo, más de la mitad de dicha superficie se mantiene por irrigación (CIMMYT, 2009).

Tabla 1. Principales productores de trigo en el año 2015.

País	Cosecha (toneladas métricas)
Unión Europea	160,006,000
China	130,190,000
India	86,530,000
Rusia	61,044,00
Estados Unidos	55,840,000
Otros	55,578,000

Fuente: Producción Mundial de Trigo, 2016 (<https://www.produccionmundialtrigo.com>)

Estrés por Sequía

El estrés se define como una desviación significativa de las condiciones óptimas para la vida. Desde el punto de vista de la Biología, se le llama estrés al “conjunto de respuestas bioquímicas o fisiológicas que definen un estado particular del organismo diferente al observado bajo un rango de condiciones óptimas” (Basurto y col., 2008).

El déficit de agua afecta directa y rápidamente los procesos metabólicos de las plantas (Basurto y col., 2008). La sequía es el tipo de estrés abiótico que más afecta al rendimiento de los cultivos y es responsable de provocar diversos procesos metabólicos en las plantas, siendo el aparato fotosintético uno de los más afectados por esta (Budak y col., 2013; Chakraborty y Pradhan, 2012).

Las predicciones respecto a los efectos del calentamiento global sobre el trigo sugieren que la situación para su producción será complicada, sobre todo en países en desarrollo (CIMMYT, 2009). Estos retos representan también una oportunidad para desarrollar, diseminar y comercializar variedades de trigo que sean más productivas y más tolerantes a estrés, cuya producción además esté basada en prácticas agrícolas más sustentables, por ejemplo, conservando los recursos como el agua y el suelo (CIMMYT, 2009).

México tiene una superficie agrícola de 31,691,868 hectáreas, de las cuales ocho millones se encuentran en zonas áridas y semiáridas, constituyendo el 41% de la superficie destinada a agricultura. Es en estas regiones donde las cosechas se ven más afectadas, siendo las principales causas de pérdidas las heladas y las sequías (Basurto y col., 2008).

En el período de 1930 a 1997, en el norte del país se registraron sequías cada vez más intensas, siendo clasificadas 20 de ellas como severas y seis como extremadamente severas (Basurto y col., 2008).

La creciente población mundial necesita cada vez más alimento y más energía para satisfacer sus necesidades, sin embargo, la disminución en el suministro de agua para la agricultura, junto a los efectos del cambio climático, están aumentando los niveles de estrés abiótico a lo largo de las principales áreas de producción de trigo (CIMMYT, 2009).

Durante el estrés por sequía, pueden ocurrir cambios en la fotosíntesis que pueden llevar a una inhibición del crecimiento y provocar el cierre de los estomas de las plantas, reduciendo su tasa de transpiración y disminuyendo así la concentración de CO₂ dentro de las hojas (Chakraborty y Pradhan, 2012; Flexas y Medrano, 2002). Cuando el cierre de los estomas es más completo, la actividad del transporte de electrones también es afectada, disminuyendo la síntesis de ATP. Se considera que el cierre de los estomas es la principal causa de la reducción en la tasa de fotosíntesis (Flexas y Medrano, 2002). La sequía también puede provocar una degradación de las moléculas de clorofila y una acumulación de carotenos (Chakraborty y Pradhan, 2012).

Otros parámetros, como la concentración de ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP), sustrato del ciclo de Calvin, así como la actividad de la enzima Rubisco también se ve afectada progresivamente durante períodos de sequía (Budak y col., 2013; Flexas y Medrano, 2002).

La fotosíntesis en las plantas de trigo durante períodos de sequía se ve afectada por daños sobre el fotosistema II (PSII). Además, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), principalmente en el cloroplasto y en la mitocondria, resulta en daño oxidativo y peroxidación lipídica lo que podría tener un efecto desfavorable en el crecimiento de las raíces (Budak y col., 2013).

Se proyecta que el cambio climático actual impactará significativamente en los perfiles de temperatura y precipitación, aumentando la incidencia de sequías severas (Budak y col., 2013). La preocupación respecto a dichos factores ambientales hace

evidente la necesidad de enfocar esfuerzos en el desarrollo de la tolerancia a sequía y la mejora de la eficiencia de uso de agua en los cultivos de trigo (CIMMYT, 2009).

Respuesta a estrés. Las respuestas de las plantas a estrés incluyen aspectos como la limitación en el crecimiento, cambios en la expresión de genes, niveles hormonales alterados, inducción y supresión de algunas vías metabólicas; además, ocurren aumentos en la peroxidación de lípidos, produciendo altos niveles de especies reactivas del oxígeno (ROS) y niveles aumentados de actividad antioxidante (Budak y col., 2013).

Para enfrentar el estrés, las plantas también sintetizan proteínas, como las desaturasas lipídicas, proteínas de estrés, proteínas de choque térmico y enzimas que catalizan la síntesis de antioxidantes, de transportadores de iones y de osmoprotectores (Suárez y col., 2009).

Otra respuesta a estrés de algunas plantas es la acumulación de ciertos metabolitos, también llamados “osmolitos” o “solutos compatibles”, los cuales están involucrados en el ajuste osmótico de la célula, funcionan como depósitos de ROS y protegen a las proteínas y estructuras celulares. Por lo general, este tipo de compuestos son azúcares como la trehalosa, derivados alcohólicos como el manitol, compuestos cuaternarios de amonio y sulfonio como la glicina betaína y el sulfopropionaldehído y aminoácidos como la prolina (Budak y col., 2013).

Estudios en plantas de trigo, encontraron que durante la respuesta a estrés por sequía, ocurren cambios en los niveles de proteínas como las dehidrinas y proteínas LEA (*late embryogenesis abundant proteins*), así como de acuaporinas y HKT-1, transportador de sodio y potasio (Budak y col., 2013). También se ha encontrado que *T. aestivum* tiene una tolerancia intermedia a salinidad, asociada con un mecanismo de exclusión del Na⁺ en la hoja y la concentración de osmolitos que protegen a la hoja, como la glicina betaína y la prolina (Fischer, 2011).

Glicina betaína. La glicina betaína (GB) es un osmolito y osmoprotector con la capacidad de mantener las funciones celulares. Su síntesis es catalizada por la enzima betaína aldehído deshidrogenasa (BADH), que cataliza la oxidación de la betaína aldehído, utilizando NAD⁺ como cofactor para la formación de GB. Se conoce que la GB puede acumularse como respuesta a estrés osmótico en diversos organismos, siendo

capaz de proteger a las enzimas contra salinidad, calor, deshidratación y congelamiento (Muñoz-Clares y Velasco-García, 2004).

En plantas, se sabe que la GB además de proteger membranas y proteínas, ayuda a estabilizar los complejos proteína-pigmento del fotosistema II durante condiciones de estrés (Papageorgiou y Morata, 1995).

Fotosíntesis

La fotosíntesis (del griego *photos*, “luz” y *synthesis*, “síntesis”) es el proceso fisicoquímico mediante el cual organismos como plantas, algas y algunas bacterias, utilizan la energía luminosa para producir diversos compuestos orgánicos (Whitmarsh y Govindjee, 1999).

En las plantas, el proceso fotosintético utiliza el CO₂ de la atmósfera, agua y energía luminosa, para la producción de moléculas orgánicas, como carbohidratos, produciendo la liberación de oxígeno. Para el estudio de este proceso metabólico, se divide en dos fases, las cuales se conocen como fase “luminosa” y fase “oscura” (Whitmarsh y Govindjee, 1999; Horton, 2008) (figura 2).

En el proceso de fotosíntesis, influyen factores reguladores internos, como la actividad de la enzima Rubisco y el contenido de clorofila en las hojas y factores externos, como el suelo y la disponibilidad de agua (Gutiérrez-Rodríguez y col., 2004). Esta vía metabólica es clave en el rendimiento de los cultivos, por lo que la mejora de su capacidad y eficiencia es uno de los objetivos principales a alcanzar para aumentar la productividad de los cultivos, debido a que toda la materia seca producida depende totalmente de este proceso (Cossani y Reynolds, 2012; Gutiérrez-Rodríguez y col., 2004).

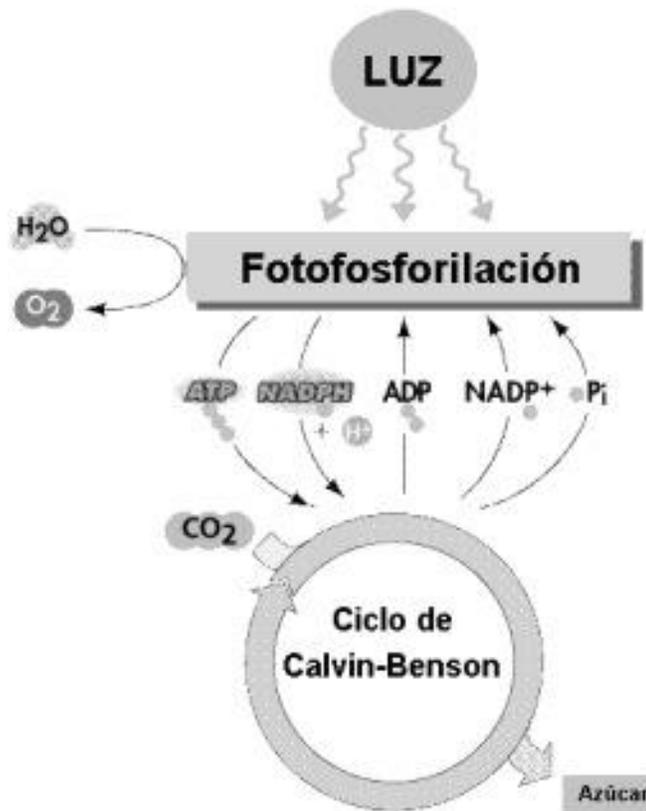


Figura 2. Fases e intermediarios de la fotosíntesis (Fuente: <http://www.profesorenlinea.cl>)

Fase luminosa. La fase luminosa adquiere este nombre porque es donde ocurren las reacciones dependientes de la luz. En esta parte del proceso, la energía luminosa proveniente del Sol, incide sobre las moléculas de clorofila, que son los pigmentos que se encuentran en los cloroplastos de la hoja, excitando a los electrones, quienes elevan su nivel de energía. Al volver a su estado basal, esa energía excita a otro electrón, permitiendo el paso de protones a través de la membrana tilacoidal. En esta fase, se utiliza la molécula de agua como sustrato, la cual al hidrolizarse, genera oxígeno como producto (Horton, 2008).

El gradiente de protones formado impulsa la fosforilación del adenosín difosfato (ADP) mediante la acción de la enzima ATP sintasa, para producir adenosín trifosfato (ATP). También existe formación de poder reductor en forma de NADPH, molécula que junto al ATP, servirán como fuente de energía en las reacciones ocurridas en la fase oscura de la fotosíntesis (Horton, 2008).

Clorofila. Las clorofilas son las moléculas de pigmentos más importantes en el proceso de la fotosíntesis, las cuales se encuentran en los cloroplastos de la célula vegetal (Horton, 2008).

La estructura de la molécula de clorofila consiste en un anillo de porfirina con un átomo de magnesio al centro. Los dobles enlaces conjugados presentes en su estructura son los que le permiten absorber la luz en la región de violeta a azul (650 a 700 nm) y en la de naranja a rojo (400 a 500 nm) del espectro electromagnético, reflejando el color verde característico de la mayoría de las plantas (Horton, 2008).

Existen diversos tipos de clorofila, las cuales difieren en la cadena lateral en su estructura. En plantas, los tipos de clorofila más importantes son la clorofila a, la cual se encuentra presente en todas las plantas fotosintéticas y la clorofila b, que está presente en la mayoría de las plantas verdes. La clorofila a tiene un grupo metilo como cadena lateral, mientras que la clorofila b tiene un grupo carbonilo (Bidwell, 1993; Horton, 2008) (figura 3).

En la naturaleza generalmente la clorofila a es más abundante que la clorofila b, en un relación a/b aproximada de tres a uno. Sin embargo, las condiciones en las que se encuentre la planta pueden modificar esta distribución. Por ejemplo, se sabe que las plantas expuestas a intensidades de luz muy altas tienen relaciones a/b más altas, mientras que en plantas que crecen en intensidades de luz bajas, dicho radio disminuye (Lichtenhalter, 1987).

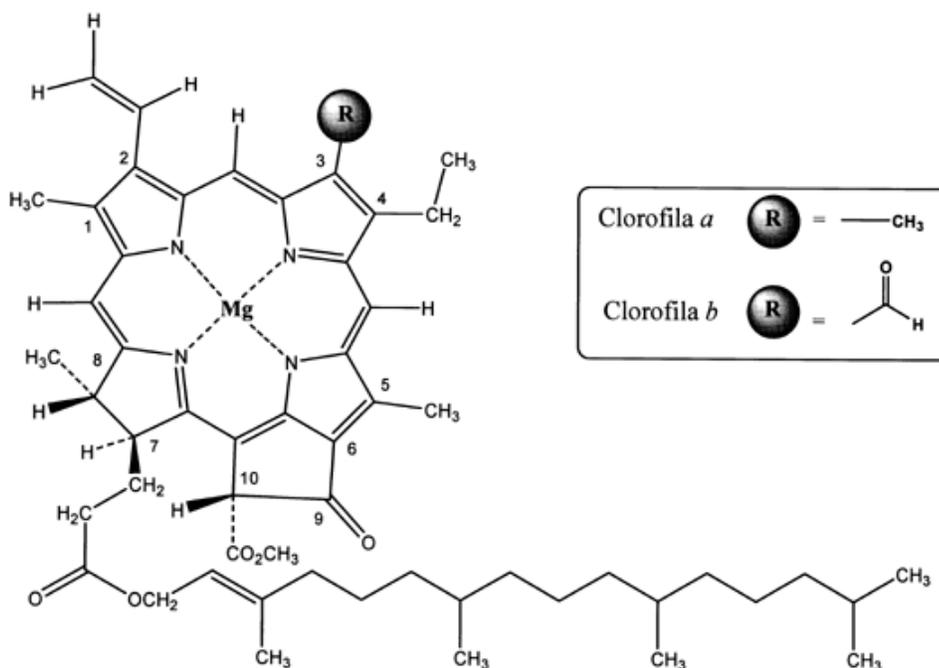


Figura 3. Estructura de la molécula de clorofila y las diferencias entre la clorofila a y b (Streit y col., 2005).

Fase oscura. En la fase oscura de la fotosíntesis, se utiliza la energía formada por las reacciones de la fase anterior para la síntesis de carbohidratos, a través de la fijación del CO₂ catalizada por la enzima ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco). A esta vía metabólica se le conoce también como ciclo de Calvin (Horton, 2008).

En su función como carboxilasa, la Rubisco cataliza la unión covalente del CO₂ a la RuBP, un azúcar de cinco carbonos, para formar dos moléculas de 3-fosfoglicerato (3PGA) (Lehninger, 2005). Se ha relacionado que una mayor fijación de CO₂ contribuye a un mejor rendimiento de los cultivos (Gutiérrez-Rodríguez, 2004).

Sin embargo, la Rubisco también actúa como oxigenasa en la conversión de 2-fosfoglicerato a 3PGA en las plantas C₃, conocida como “vía fotorrespiratoria”, en la cual se consume ATP y se pierde una parte del CO₂ fijado, llegando a pérdidas de hasta el 30%. El nivel de fotorrespiración depende de las concentraciones de oxígeno y de CO₂ que existan en el ambiente intracelular, así como de la relación carboxilación/oxigenación. Se sabe también que la afinidad de esta enzima por el CO₂ disminuye conforme aumenta la temperatura, puesto que sus sitios activos se inactivan progresivamente con el estrés por calor. Por lo anterior, se considera a la reacción de oxigenación de la Rubisco como

una de las mayores limitantes en su eficiencia y en la acumulación de biomasa en las plantas (Cossani y Reynolds, 2012; García-Murria, 2006).

En las plantas C3 como el trigo, el ciclo de Calvin inicia con la entrada del CO₂, que por una reacción de carboxilación catalizada por la Rubisco, se une con la ribulosa-1,5-bifosfato (RuBP), formando una molécula de 3PGA y una de 2-fosfoglicerato, que también será convertida a 3PGA. El 3PGA se transforma en 1,3-bifosfoglicerato por la acción de la enzima fosfoglicerato cinasa en una reacción que utiliza ATP, para que posteriormente la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa catalice su conversión a gliceraldehído-3-fosfato (G3P) utilizando al NADPH como coenzima (Horton, 2008).

Una parte de las moléculas de G3P formadas se dirigen a la generación de azúcares, mientras que la otra parte se utiliza para regenerar a la RuBP de manera que el ciclo pueda llevarse a cabo una vez más. Se requieren fijar tres moléculas de CO₂ por cada molécula de G3P formada (Horton, 2008).

Metabolismo de Azúcares

Para la síntesis de otros azúcares, como la glucosa-6-fosfato (G6P) y la sacarosa, la molécula de G3P se condensa con una molécula de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) para formar fructuosa-1,6-bifosfato (F6P). Este metabolito es el precursor para la formación de otras moléculas de carbohidratos, ya que mediante una isomerasa, puede transformarse a glucosa-6-fosfato, la cual a su vez puede dirigirse a la síntesis de sacarosa, para transportar energía hacia otros tejidos, o de almidón, para la reserva de esta (figura 4).

Una vez que la planta requiera energía, las moléculas de azúcares pueden utilizarse vía glucólisis, que es la ruta metabólica mediante la cual la célula utiliza la molécula de glucosa para convertirla en piruvato (el cual se utiliza en el ciclo de Krebs) y generar ATP (Horton, 2008).

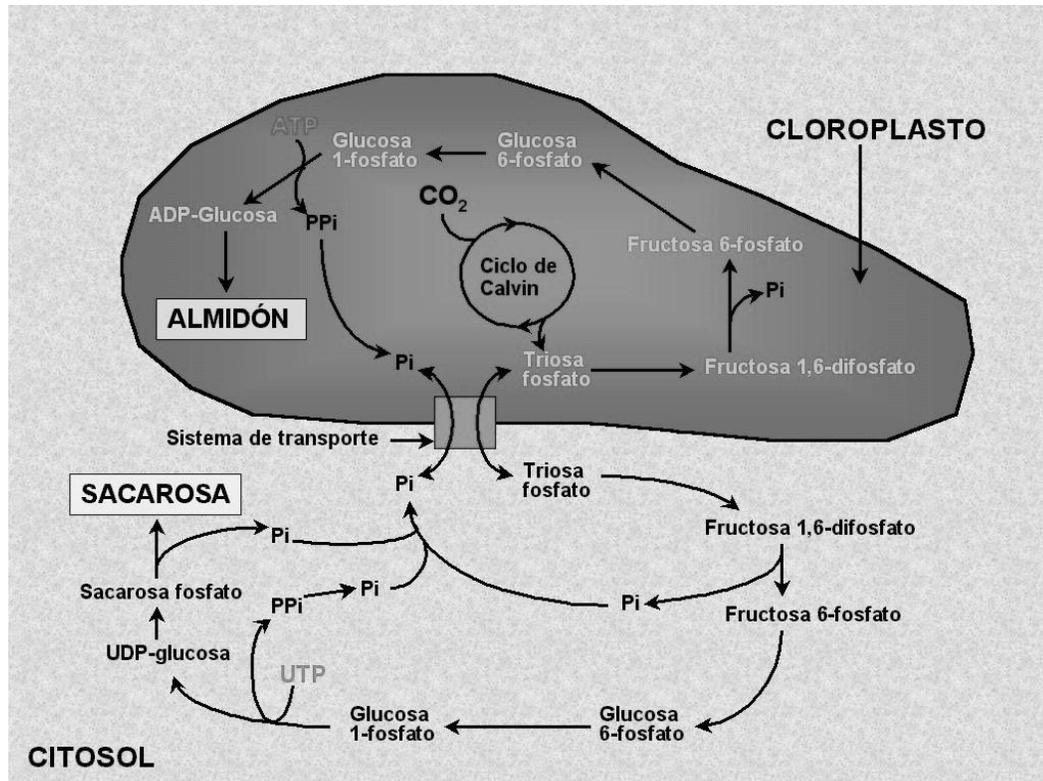


Figura 4. Síntesis de sacarosa y de almidón a partir del ciclo de Calvin
(Fuente: <http://www.euita.upv.es>)

La glucólisis consiste en una serie de diez reacciones donde, a pesar de que inicialmente se invierten dos moléculas de ATP, a lo largo del resto de esta vía metabólica se generan cuatro, recuperando las moléculas invertidas en la primera fase. La primera reacción es catalizada por una hexocinasa, la cual transfiere fosfato de una molécula de ATP a una molécula de glucosa, formando glucosa-6-fosfato (G6P) y ADP (Horton, 2008).

Hexocinasa. La hexocinasa es la enzima encargada de fosforilar a los azúcares de seis carbonos, como glucosa o fructosa. Su actividad se regula por la concentración de su propio producto, la G6P. Debido a que las hexosas deben ser fosforiladas antes de utilizarse en cualquier proceso metabólico, las enzimas hexocinasas son fundamentales para el metabolismo y desarrollo vegetal. Además, la fosforilación de hexosas es un proceso irreversible, por lo que se considera que la hexocinasa tiene un papel fundamental en la regulación en el metabolismo de carbohidratos en plantas (Granot y col., 2014; Horton, 2008).

Se sabe que en plantas existen hexocinasas específicas para fructosa (fructocinasas), sin embargo la hexocinasa es capaz de reconocer glucosa, fructosa, manosa e incluso glucosamina (Granot y col., 2014).

Existen datos que indican que la hexocinasa también actúa como un sensor de azúcares y que tiene un papel regulador en la vía glucolítica y en la fotosíntesis. Cuando en los tejidos fotosintéticos de la planta la concentración de glucosa es muy alta, la alta actividad de la HK puede inhibir la fotosíntesis y degradar las moléculas de clorofila de las hojas como un intento de evitar la producción de más azúcares para permitir la utilización de los que ya se encuentran en la planta (Dai y col., 1999; Granot y col., 2014).

Trehalosa

La trehalosa (α -D-glucopiranosil- α -D-glucopiranosido) es un disacárido no reductor, formado por dos moléculas de glucosa unidas por enlace glucosídico α - α -1-1 (figura 5). Esta molécula se caracteriza por su habilidad protectora, su estabilidad y su baja reactividad, pudiendo soportar el calor hasta de 100 °C y pH de 3.5 hasta 10 por 24 h. Debido a que es un azúcar no reductor, no lleva a cabo la reacción de Maillard (Paul y col., 2008).

Industrialmente, la trehalosa es utilizada como aditivo en algunos productos alimenticios, puesto que conserva mejor las propiedades organolépticas de estos; también como crioprotector celular en medicina y como un componente en productos cosméticos (Mascorro y col., 2005; Paul y col., 2008).

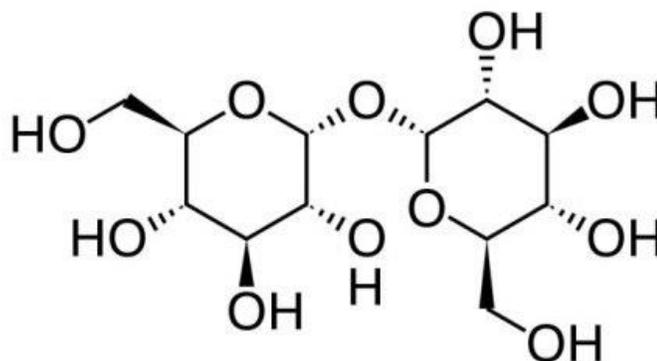


Figura 5. Estructura de la molécula de trehalosa.

Abundancia en la Naturaleza

La trehalosa puede ser sintetizada por todos los organismos, excepto por los vertebrados. Se encuentra en concentraciones altas en organismos como hongos y bacterias (Paul y col., 2008). La presencia de trehalosa en *Saccharomyces cerevisiae* se relaciona con su termotolerancia, resistencia al frío y estrés hídrico, así como contra las ROS (Cortina y Culiáñez-Macià, 2005).

La trehalosa se encuentra ampliamente distribuida en el reino vegetal, pero solamente se acumula en las plantas conocidas como “de la resurrección”, como *Selaginella lepidophylla* (Garg y col., 2002). A pesar de que los humanos y animales superiores no sintetizan la trehalosa, se sabe que sí cuentan con la enzima trehalasa, la cual cataliza la degradación de este disacárido (Mascorro y col., 2005).

Síntesis

Se conocen cinco vías metabólicas para la biosíntesis de trehalosa, siendo la más distribuida la vía TPS-TPP, la cual ocurre en dos pasos, donde primero ocurre una reacción catalizada por la enzima trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) y otra por la enzima trehalosa-6-fosfato fosfatasa (TPP). La trehalosa después puede ser degradada por la enzima trehalasa en dos moléculas de glucosa (Paul y col., 2008) (figura 6).

Esta vía se ha reportado en diversas especies de bacterias como *Escherichia coli*, levaduras como *S. cerevisiae*, insectos y en plantas de la resurrección como *S. lepidophylla* (Garg y col., 2002; Suárez y col., 2009; Valenzuela-Avedaño y Valenzuela-Soto, 2009).

En especies como *Arabidopsis thaliana*, arroz (*Oryza sativa*) y otras plantas superiores, se han encontrado enzimas homólogas para la TPS y TPP; sin embargo, estas no son capaces de acumular cantidades significativas de trehalosa (Suárez y col., 2009).

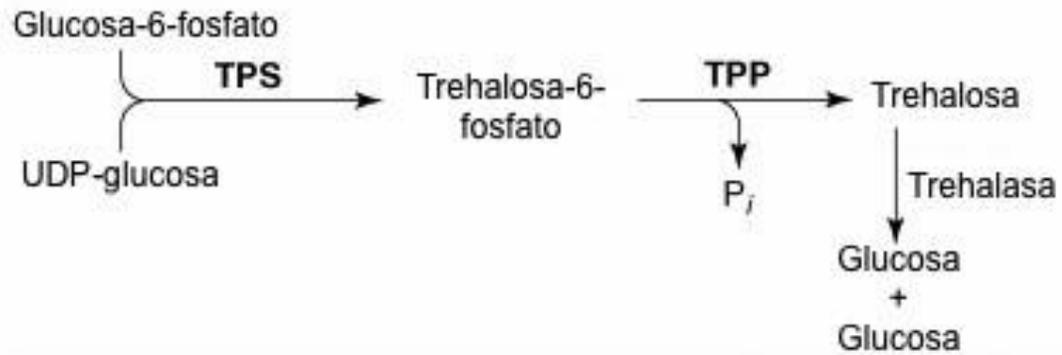


Figura 6. Vía TPS-TPP para síntesis de trehalosa (Paul y col., 2008).

TPS y TPP. La primera enzima que actúa en la síntesis de trehalosa es la TPS, la cual cataliza la transferencia de la glucosa de la molécula de uridina difosfato glucosa (UDPG) hacia una molécula de glucosa-6-fosfato, para formar el intermediario trehalosa-6-fosfato (T6P). La segunda reacción es catalizada por la TPP, que desfosforila a la molécula de T6P, formando la trehalosa y liberando fosfato inorgánico (Paul y col., 2008).

En *S. cerevisiae*, la enzima homóloga de la TPS (TPS1) se encuentra formando un complejo con la enzima homóloga de la TPP (TPS2), más dos subunidades reguladoras (TPS3) y la cadena larga de trehalosa sintasa (TSL), mientras que en *E. coli*, las enzimas TPS y TPP se encuentran de forma independiente. Mediante el análisis de la secuencia nucleotídica para ambas enzimas, se ha encontrado que tanto la TPS como la TPP se mantienen altamente conservadas a lo largo de la naturaleza para mantener su función (Paul y col., 2008).

Función Osmoprotectora

La trehalosa tiene una capacidad de retención de agua muy alta, lo que le permite mantener la fluidez de las membranas y estabilizar proteínas cuando la planta se enfrenta a condiciones de sequía (Garg y col., 2002; Jang y col., 2003). Esta molécula resulta muy eficiente para mantener los lípidos en una fase fluida en ausencia de agua, evitando la separación de fases, fugas o la fusión de las membranas (Suárez y col., 2015).

Una de las propiedades de la trehalosa es la habilidad de reemplazar a la molécula de agua formando puentes de hidrógeno con los residuos polares de las proteínas y membranas, manteniendo la estructura terciaria y actividad de estas (Mascorro y col., 2005; Paul y col., 2008) (figuras 7 y 8). Durante la deshidratación, se ha observado que en

plantas resistentes a desecación el contenido de trehalosa aumenta hasta un 12%, mientras que en la rehidratación, este contenido disminuye y las plantas recuperan su viabilidad (Jang y col., 2003).

Existen datos que indican que la trehalosa estabiliza a las proteínas en su estado nativo y reduce la agregación de estas en forma desnaturalizada, lo cual podría explicar su rápida degradación una vez que termina el estrés (Cortina y Culiáñez-Macià, 2005).

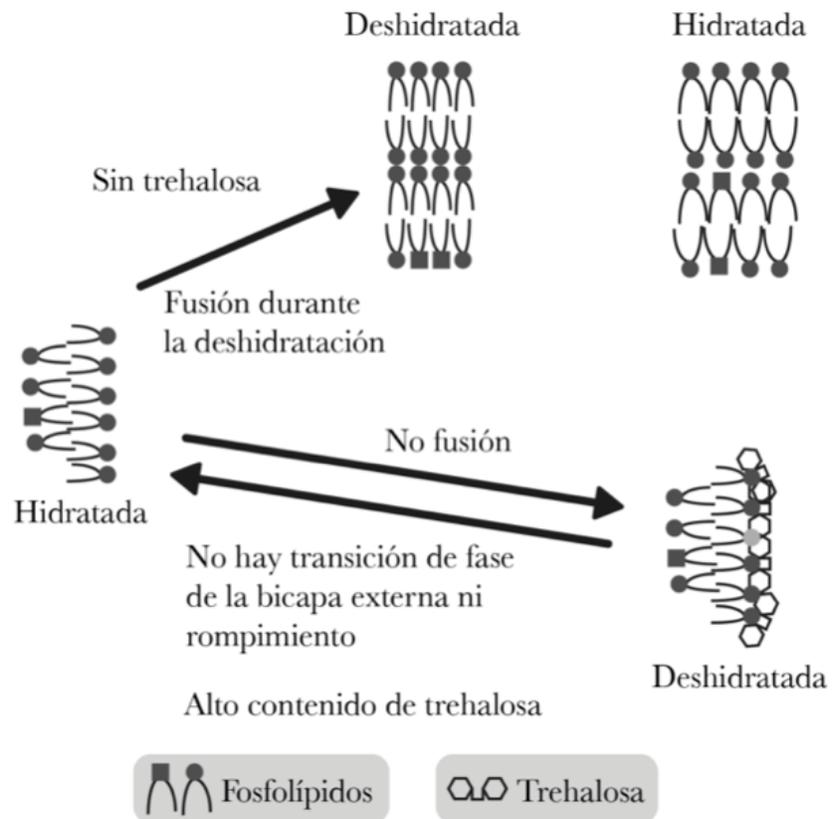


Figura 7. Mecanismo de acción protectora de la molécula de trehalosa sobre las membranas celulares durante la desecación (Suárez y col., 2015).

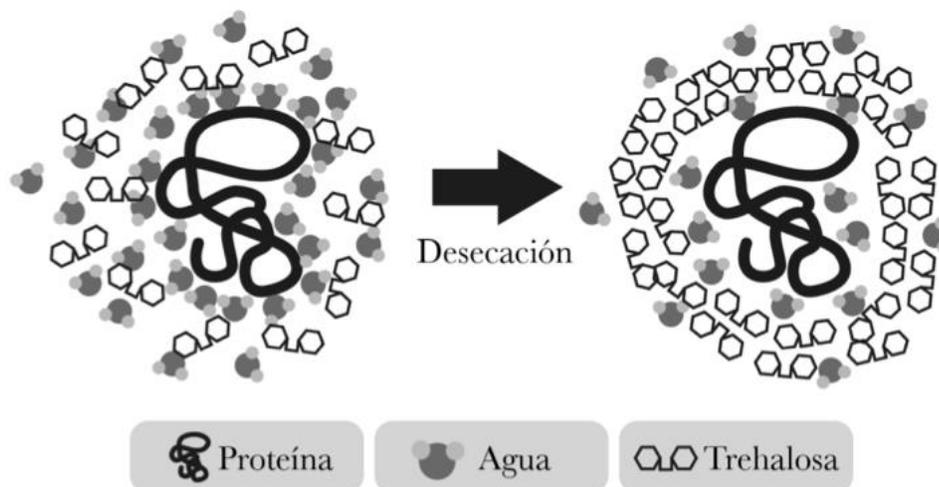


Figura 8. Mecanismo de acción protectora de la molécula de trehalosa sobre las proteínas durante la desecación (Suárez y col., 2015).

Transformación de Cultivos para su Tolerancia a Estrés Hídrico

Los avances en biotecnología han permitido desarrollar cultivos más resistentes a las condiciones ambientales adversas. Diversos autores han trabajado con la modificación genética de cultivos importantes para la producción de alimentos. Específicamente para mejorar la tolerancia a estrés por sequía, se ha propuesto la inserción de genes para aumentar su capacidad de síntesis de trehalosa como una alternativa. Algunos de los estudios realizados al respecto se presentan en la tabla 2.

Los cultivos genéticamente modificados de trigo aún no han sido aprobados para su producción comercial en ningún país del mundo. Sin embargo, se ha permitido la siembra de variedades desarrolladas para una mejor resistencia a sequía, enfermedades y herbicidas únicamente para su estudio en algunos países como Australia, Canadá, Alemania, Suiza y EUA (CIMMYT, 2009).

Tabla 2. Estudios realizados sobre la transformación de plantas con genes para síntesis de trehalosa.

Autor	Organismo
Yeo y col. (2000)	Papa (<i>S. tuberosum</i>)
Garg y col. (2002)	Arroz (<i>O. sativa</i>)
Jang y col. (2003)	Arroz (<i>O. sativa</i>)
Pellny y col. (2004)	Tabaco (<i>N. tabacum</i>)
Miranda y col. (2007)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Suárez y col. (2009)	Alfalfa (<i>M. sativa</i>)
Lyu y col. (2012)	Tomate (<i>S. lycopersicum</i>)
Yellisetty y col. (2015)	Sorgo (<i>S. bicolor</i>)

Transformación con el Gen para TPS

Se han realizado estudios con el fin de mejorar la tolerancia a estrés abiótico introduciendo el gen para la expresión de TPS a partir de microorganismos en plantas de arroz, las cuales mostraron una mejora en su tolerancia a sequía. Sin embargo, también se observaron fuertes alteraciones en su crecimiento (Jang y col., 2003).

En el trabajo realizado por Yeo y col. (2000) en plantas de papa transformadas para expresar la enzima TPS1, se demostró que aunque las plantas mostraron una tolerancia a sequía, estas tuvieron un crecimiento y desarrollo fuera de lo normal. En plantas de tomate transformadas para sobre expresar la misma enzima, se observó que durante condiciones normales de crecimiento, hubo un contenido de clorofila más alto, así como una mayor acumulación de almidón; las plantas también fueron más tolerantes a estrés oxidativo. No obstante, también se presentaron efectos en la fisiología de la planta y un metabolismo alterado (Cortina y Culiáñez-Macià, 2005).

De manera similar, en las plantas de sorgo transformadas estudiadas por Yellisetty y col. (2015), las cuales a pesar de haber tenido una mejor tolerancia a salinidad, también se encontró que mostraban diferencias fenotípicas.

Efectos de la T6P. Existen reportes en numerosos estudios de que la alteración en los niveles de T6P tiene efectos en el metabolismo y desarrollo de los organismos

(Paul y col., 2008). Se ha propuesto que la T6P puede tener un papel como molécula señalizadora en la coordinación del metabolismo de carbohidratos con el desarrollo de la planta al afectar la distribución de carbohidratos, lo que lleva a una inhibición del crecimiento (Mascorro y col., 2005; Suárez y col., 2009).

En estudios con plantas de papa y tabaco transformadas para la expresión consecutiva de TPS y TPP de *E. coli*, se han observado efectos negativos, como un retraso del crecimiento y un metabolismo alterado, aún bajo condiciones normales de crecimiento (Garg y col., 2002; Yeo y col., 2000).

En levaduras, la T6P tiene un efecto inhibitorio sobre la enzima hexocinasa, lo que afecta la regulación del flujo de glucosa hacia la glucólisis, lo que ha llevado a especular que la T6P puede causar alteraciones fenotípicas en las plantas transformadas (Jang y col., 2003). En tomate, la expresión de la enzima TPS alteró la biosíntesis de carbohidratos, llevando a una mayor acumulación de almidón y provocando cambios pleiotrópicos (Cortina y Culiáñez-Macià, 2005). En *Arabidopsis thaliana*, se observó que la expresión de la TPS1 también inhibió la fotosíntesis y llevó a una mayor producción de almidón (Granot y col., 2014).

Transformación con la Enzima Bifuncional TPS-TPP

La fusión de los genes para síntesis de TPS y de TPP, ha permitido crear una enzima bifuncional, con las ventajas de tener una eficiencia catalítica neta más alta para la formación de trehalosa y de reducir la acumulación de T6P, metabolito potencialmente tóxico (Garg y col., 2002; Jang y col., 2003).

Estudios como el de Garg y col. (2002) mostraron que plantas de arroz transformadas para la expresión de esta enzima bifuncional, tuvieron una mayor acumulación de trehalosa y una mejor tolerancia a salinidad, sequía y bajas temperaturas, sin tener algún efecto perjudicial en la planta o en el grano. Resultados similares se encontraron en el estudio realizado por Jang y col. (2003), donde las plantas de arroz, también transformadas con la enzima bifuncional, además de tener una mejor tolerancia a deshidratación y salinidad, mantuvieron una tasa de fotosíntesis eficiente durante las condiciones adversas. Los autores Miranda y col. (2007) realizaron la misma transformación de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, la cual mostró tener un aumento significativo en su tolerancia a sequía, congelamiento, salinidad y calor sin alteraciones morfológicas o en su crecimiento.

En el trabajo realizado por Lyu y col. (2012) se estudiaron plantas transgénicas de tomate transformadas con el gen para la enzima bifuncional, donde se detectó una acumulación de trehalosa y, después de siete días sin riego, no mostraron cambios en su contenido de clorofila, sugiriendo que dichas plantas fueron más tolerantes a la sequía que las plantas nativas. Las plantas fueron también más tolerantes a salinidad, pues exhibieron tasas fotosintéticas más altas que las plantas nativas durante el periodo de estrés. Esto concuerda también con el trabajo realizado por Suárez y col. (2009), donde las plantas de alfalfa con la misma transformación de igual manera mostraron una mejor tolerancia a diversos tipos de estrés abiótico, como salinidad y calor.

Adicionalmente, en el trabajo realizado por Valenzuela-Avendaño (2012) se llevó a cabo la transformación de embriones de trigo para la expresión de una enzima bifuncional TPS/TPP para aumentar su capacidad de síntesis de trehalosa, obteniendo plantas que fueron más resistentes a las condiciones de estrés por sequía y salinidad (Cabral-Torres, 2014; Valenzuela Avendaño, 2012).

A pesar del aumento en su tolerancia a estrés abiótico, ninguno de los organismos estudiados en los trabajos anteriormente mencionados reportó tener alteraciones en su crecimiento o fisiología. Por lo tanto, dichos resultados sugieren que la transformación con una enzima bifuncional TPS/TPP es más efectiva que la transformación únicamente con TPS y que, además, podría tener aplicación práctica en la mejora genética de los diferentes cultivos destinados a la producción de alimento para que estos sean más tolerantes a las condiciones climáticas adversas y tengan un mejor rendimiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Biológico

Se utilizaron semillas de trigo (*T. aestivum*) de la variedad Kronstad F2004 generación T4 previamente transformadas por Valenzuela-Avendaño (2012), con un gen para la enzima bifuncional TPS-TPP para síntesis de trehalosa de *S. cerevisiae* (*ScTPS1-TPS2*), con el promotor rd29A, el cual es inducible bajo estrés y el gen de selección que confiere resistencia al herbicida fosfinotricina (PPT), de las cuales se obtuvieron las líneas RD1A, RD1B y RD1C.

Esterilización de Semillas

Para su esterilización las semillas se sumergieron en una solución de Tween 20 al 0.05% durante 30 min con agitación suave constante para posteriormente recibir tres lavados con agua estéril de 30 min con agitación suave constante. Después para su desinfección las semillas se sumergieron en una solución de PPM (Preservative Plant Mixture) al 10% durante 20 min con agitación suave contante y posteriormente recibieron tres lavados con agua estéril de 40 min con agitación suave constante.

Generación de Plantas

Las semillas se pusieron a germinar en cajas Petri con un papel filtro húmedo en condiciones de oscuridad a una temperatura de 30°C hasta que desarrollaron el hipocotilo. Posteriormente se pasaron a luz en períodos de 16 h de luz y 8 h de oscuridad hasta que desarrollaron raíces para así ser plantadas en charolas con tierra. Una vez que las plantas desarrollaron la primera hoja fueron trasplantadas a macetas con tierra y llevadas al invernadero.

Inducción de estrés por Sequía

Para iniciar el tratamiento de estrés por sequía, una vez que las plantas cumplieron las seis semanas de edad dejaron de recibir suministro de agua. Se midió la humedad del suelo cada 24 h con un medidor de humedad de suelo de dos conectores con escala de 1

a 10, hasta que la tierra se encontraba en un valor de 8. A partir de ese punto, se contabilizaron los días hasta completar los días 2, 4 y 8 de sequía.

Contenido Relativo de Agua

Para conocer el estado de hidratación de las plantas a lo largo de los días del tratamiento de sequía se midió su contenido relativo de agua (CRA). Se cortó una hoja de la planta y se pesó para registrar su peso fresco (PF). Después la muestra se dejó hidratar en una caja Petri llena con agua destilada hasta peso constante y obtener el peso turgente (PT). Posteriormente la muestra se dejó secar en una estufa a 70°C hasta peso constante para obtener el peso seco (PS).

Para calcular el %CRA se utilizó la siguiente fórmula:

$$\%CRA = \frac{PF - PS}{PT - PS} \times 100$$

Determinación de Contenido de Clorofila a, b y total

Para determinar la concentración de clorofila a, b y total, se pesaron 0.15 g de tejido de hoja, se congelaron con nitrógeno líquido y se pulverizaron con un mortero con mano. Se agregaron 1.5 mL de acetona al 80% y se incubó la muestra por dos h en oscuridad. Después se centrifugó la muestra a 10000 rpm durante 10 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se le añadieron 1.5 mL de acetona al 80% al precipitado remanente para repetir los pasos anteriores dos veces más. Se juntaron los sobrenadantes de las tres centrifugaciones y se aforaron a un volumen de 4.5 mL y se tomó lectura de sus absorbancias a las longitudes de onda de 645, 663 y 665 nm.

Para calcular el contenido de clorofila a, b y total se utilizaron las siguientes fórmulas, respectivamente:

$$\text{Clorofila a (mg/L)} = (12.7 \times A_{663}) - (2.69 \times A_{645})$$

$$\text{Clorofila b (mg/L)} = (22.9 \times A_{645}) - (4.68 \times A_{663})$$

$$\text{Clorofila total (mg/L)} = (8.02 \times A_{663}) + (20.2 \times A_{645})$$

Parámetros Fotosintéticos

Se utilizó el equipo *LCi Portable Photosynthesis System* (ADC Bioscientific Ltd, Hertfordshire UK) para obtener los parámetros de tasa de asimilación de CO₂ (A), tasa de transpiración (E), conductancia estomática del agua (gs) y concentración subestomática de CO₂ (Ci), a partir de los cuales se calcularon la eficiencia del uso del agua (A/E) y la eficiencia de asimilación del CO₂ (A/Ci).

Obtención de Extractos

Para la obtención de los extractos se pesó 1 g de tejido vegetal y se congeló con nitrógeno líquido para pulverizarse con un mortero con mano. Se añadieron 4.45 mL de búffer de extracción (Tris-HCl 50 mM pH 7.5 con MgCl₂ 2mM), 0.045 mL de PMSF 100 mM, 0.025 mL de coctel de inhibidores de proteasas y 45 mg de PVP. La muestra se centrifugó a 10,000 rpm por 20 min a 4°C, se recuperó el sobrenadante y se llevó a una segunda centrifugación a 10,000 rpm por otros 20 min a 4°C. Los extractos crudos obtenidos se utilizaron para la determinación de actividad enzimática de TPS, trehalasa, hexocinasa y BADH.

Determinación de Actividad de Hexocinasa

La actividad de la enzima hexocinasa se midió siguiendo la metodología descrita por Soñanez-Organis y col. (2011). Se midieron 100 µL de extracto crudo y se mezclaron 200 µL de búffer de actividad (HEPES 325 mM pH 8 con KCl 37.5 mM y MgCl₂ 33.25 mM), 20 µL de glucosa 1 M, 20 µ de ATP 30 mM, 20 µL de NAD 4 mM y 5 U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en una celda para medir el cambio en la absorbancia a 340 nm durante 3 min a 30 °C.

Determinación de Actividad de Trehalosa-6-fosfato Sintasa

La actividad de trehalosa-6-fosfato sintasa (TPS) se midió realizando un ensayo acoplado según el método descrito por Hottiger y col. (1987). En la primera parte se llevó a cabo la formación de trehalosa-6-fosfato tomando 30 µL de extracto crudo, al cual se le agregaron 57 µL de búffer HEPES 0.2 M pH 7.1 con MgCl₂ 0.05 M, 12 µL de glucosa-6-fosfato 0.2 M,

12 μL de UDP-glucosa 100 mM y 130 μL de agua. La mezcla se incubó por 30 min a 35 $^{\circ}\text{C}$ y después se hirvió durante cinco min para detener la reacción, se enfrió a 4 $^{\circ}\text{C}$ por 10 min y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min.

En la segunda parte del ensayo se llevó a cabo la conversión de trehalosa-6-fosfato hasta lactato, midiendo la oxidación del NADH. Se tomaron 200 μL del sobrenadante obtenido en el primer paso y se añadieron 70 μL de búffer HEPES 1.12 M pH 7.6, 20 μL de fosfoenol piruvato 100 mM, 20 μL de NADH 7.5 mM, 5 U de lactato deshidrogenasa, 5 U de piruvato cinasa y 150 μL de agua y se determinó el cambio en la absorbancia a 340 nm durante tres min.

Determinación de Actividad de Trehalasa

Para medir la actividad de trehalasa se realizó un ensayo compuesto de dos etapas según el método descrito por Müller y col. (1994).

En la primera reacción se midieron 25 μL de extracto crudo y se agregaron 20 μL de búffer HEPES 125 mM pH 7 y 5 μL de trehalosa 1 M. La mezcla se incubó a 30 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, después se hirvió por cinco min y se centrifugó a 5000 rpm por cinco min.

En la segunda reacción se tomaron 50 μL del sobrenadante obtenido en la reacción anterior y se agregaron 270 μL de búffer fosfato-citrato 65 mM pH 6, 2 U de glucosa oxidasa, 5 U de peroxidasa y 10 μL de O-dianisidina 7.88 mM. La mezcla se incubó a 30 $^{\circ}\text{C}$ por 60 min y después se añadieron 150 μL de H_2SO_4 12 N para detener la reacción. Se midió la absorbancia a 546 nm y se calculó la concentración de glucosa utilizando una curva de calibración de glucosa.

Determinación de Actividad de Betaína Aldehído Deshidrogenasa

La actividad de BADH se determinó según el método propuesto por Guzmán-Partida y Valenzuela-Soto (1997). Se mezclaron 16 μL de extracto crudo con 200 μL de búffer de actividad (HEPES 200 mM pH 8 con EDTA 2 mM y mercaptoetanol 14.3 mM), 20 μL de BA 10 mM, 20 μL de NAD 20 mM y 144 μL de agua y se midió el cambio en la absorbancia a 340 nm durante tres min a 30 $^{\circ}\text{C}$.

Determinación de Proteína

Para determinar la concentración de proteína se utilizó el método de Bradford (1976) usando albúmina de suero bovino como referencia.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Generación de Plantas

Se pusieron a germinar 80 semillas de plantas no transformadas (NT) y 83 semillas de plantas transformadas de la línea RD1A, 83 semillas de la línea RD1B y 73 semillas de la línea RD1C.

En las primeras 24 h, para la línea NT germinó el 57% y al tercer día germinó el 83%, que fue el porcentaje total de germinación para dicha línea. De las plantas de la línea RD1A, en 24 h germinó el 5% y el 1% de las RD1C, mientras que las RD1B tardaron más en comenzar a germinar, ya que hasta las 48 h germinó el 1%.

A los cinco días germinó el 46% de las plantas RD1A, el 8% de las RD1B y el 29% de las RD1C. Al décimo día se tenía el 72% de las RD1A, 29% de las RD1B y 92% de las RD1C. Los resultados finales del porcentaje de germinación, cuyo tiempo total fue de 22 días, se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Porcentaje de germinación total de las diferentes líneas de plantas de trigo.

Línea	% de Germinación
NT	83
RD1A	82
RD1B	64
RD1C	99

Las plantas RD1B tuvieron un tiempo de germinación más largo de los días de germinación así como el porcentaje de germinación más bajo, mientras que las RD1C fueron las semillas que germinaron más rápidamente y con mayor porcentaje de germinación.

Una vez que las plantas desarrollaron el hipocotilo, se expusieron a la luz para comenzar la síntesis de clorofilas. Todas las plántulas germinadas desarrollaron color verde aproximadamente a las cuatro horas de exposición a la luz, indicando que inició la producción de clorofilas.

Cuando las plántulas se habían tornado verdes, se trasplantaron a charolas con tierra para el desarrollo del tallo y las primeras hojas. Todas las plantas tardaron de 36 a 48 h, en alcanzar los 6 cm de altura y desarrollar la primera hoja. Después, las plantas se

trasplantaron a macetas con tierra y se llevaron al invernadero, obteniendo un 100% de sobrevivencia, pues todas las semillas que germinaron sobrevivieron al trasplante y se convirtieron en plantas.

Contenido Relativo de Agua

Para comprobar el estatus hídrico de las plantas una vez que se dejaron de regar, se midió su CRA al día cero, dos, cuatro y ocho del tratamiento. Al día cero, cuando las plantas se encontraban sin estrés, los valores de CRA fueron de 74.2% para las NT, 83.6% para las plantas RD1A, 76.9% para las RD1B y 80.8% para las RD1C (figura 9).

A los dos días de estrés, los valores para las líneas NT, RD1A, RD1B y RD1C fueron de 74.7%, 78.9%, 84.9% y 76.0%, respectivamente (figura 9).

Al día cuatro, las plantas NT tuvieron un CRA de 72.3%, las RD1A de 70.9%, las RD1B de 58.5% y las RD1C de 71.8% (figura 9).

Al octavo y último día del tratamiento, donde las plantas estaban totalmente estresadas, los valores de CRA fueron de 49.0% para las NT, 50.5% para las RD1A, 58.0% para las RD1B y 67.1% para las RD1C (figura 9).

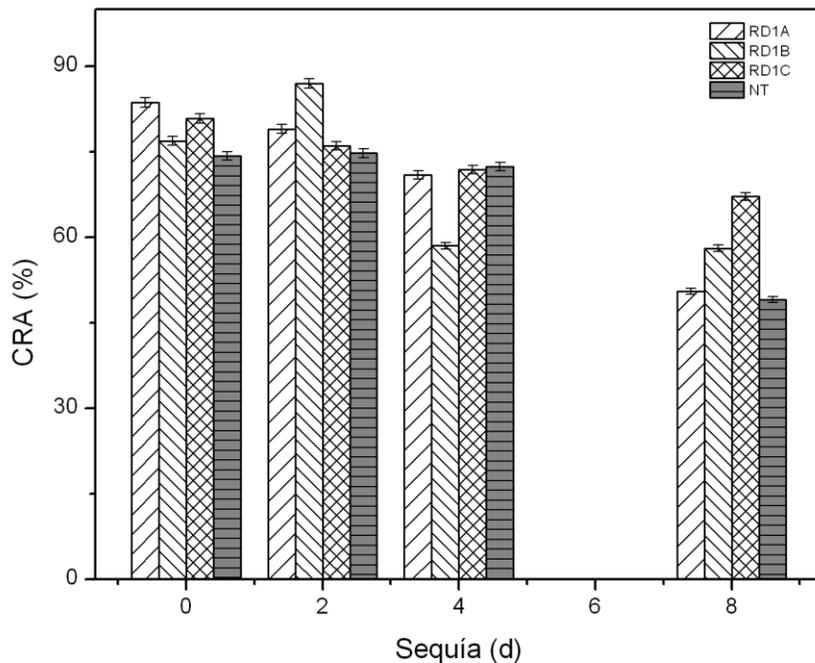


Figura 9. Contenido relativo de agua de las diferentes líneas de plantas de trigo a lo largo del tratamiento de sequía (n=6).

El CRA de todas las líneas disminuyó progresivamente durante los días de sequía, excepto en las RD1B, en las cuales se observó una recuperación en los días dos y cuatro del tratamiento. Las plantas RD1C fueron las que conservaron de manera más efectiva su CRA hasta el final del estrés, mientras que las NT se vieron más afectadas por la sequía severa al final del tratamiento.

A pesar de que en los primeros cuatro días del tratamiento de sequía los valores de CRA fueron similares para las plantas NT, al día 8 el CRA disminuyó de 74.0% hasta 49.0% como consecuencia del estrés. Las plantas transformadas conservaron mejor su CRA, las tres líneas tuvieron valores entre 50.0 y 67.0%.

Esto muestra que el tratamiento de sequía sí afectó al CRA de las plantas y que fueron las plantas transformadas con el gen para síntesis de trehalosa las que tuvieron una mejor resistencia a la sequía respecto a las NT, lo cual puede estar relacionado con la capacidad de la molécula de trehalosa de retener el agua.

Contenido de Clorofila a, b y total

Los valores obtenidos para el contenido de clorofila a lo largo del tratamiento de sequía fueron más altos en las plantas NT en todos los días del estrés. Al día cero, cuando las plantas se encontraban sin estrés, el contenido de clorofila a fue de 29.2 mg/L para las NT, 27.4 mg/L para las plantas RD1A, 24.8 mg/L para las RD1B y 24.4 mg/L para las RD1C (figura 17).

Al segundo día, la clorofila a se mantuvo igual en las plantas NT, mientras que en las plantas transformadas RD1A y RD1C disminuyó y aumentó en las RD1B (figura 17).

Al cuarto día de estrés, las plantas NT no mostraron muchos cambios respecto al día dos, mientras que en las plantas transformadas se observó que las líneas RD1A, RD1B y RD1C tuvieron una recuperación en sus niveles de clorofila a (27.4 mg/L, 24.7 mg/L y 24.6 mg/L, respectivamente) (figura 17).

Al día ocho del tratamiento, los niveles de clorofila a fueron similares entre las cuatro líneas de plantas, NT, RD1A, RD1B y RD1C quienes presentaron un contenido de 24.9 mg/L, 24 mg/L, 24.7 mg/L y 23.5 mg/L, respectivamente (figura 17).

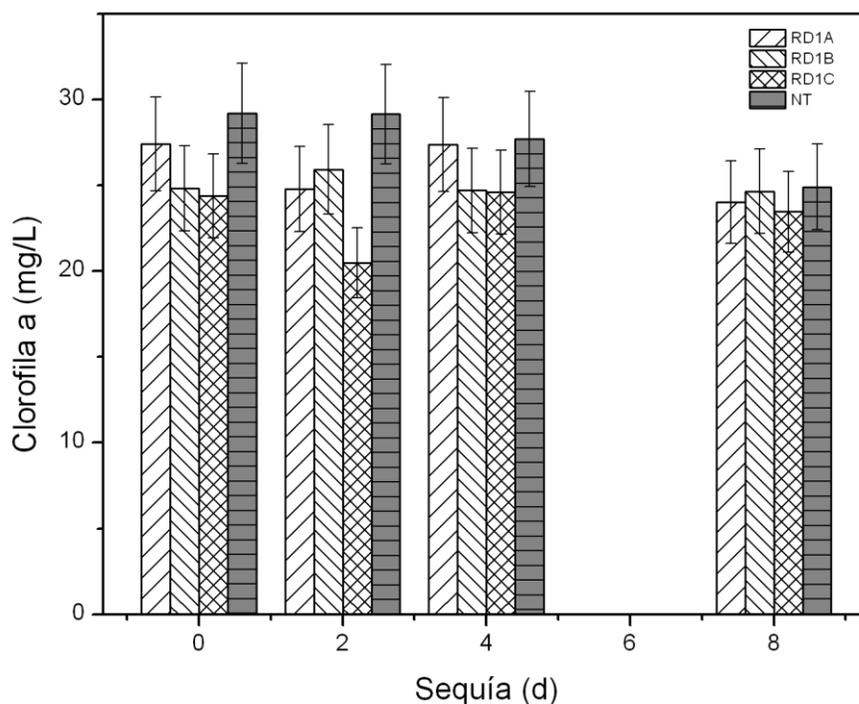


Figura 10. Contenido de clorofila a de las diferentes líneas de plantas de trigo a lo largo del tratamiento de sequía (n=3).

Los niveles de clorofila b en el día cero fueron de 23.7 mg/L, 15.9 mg/L, 21.6 mg/L, 15.4 mg/L y 23.7 mg/L para las plantas NT, RD1A, RD1B y RD1C, respectivamente (figura 18).

Al segundo día de estrés, todas las plantas tuvieron un incremento en el contenido de clorofila b respecto al día cero (28.6 mg/L, 18 mg/L, 24.7 mg/L y 30.3 mg/L para las líneas NT, RD1A, RD1B y RD1C, respectivamente) (figura 18).

Al día cuatro el contenido de clorofila b fue menor para todas las líneas que en el día dos, con valores de 23.3 mg/L para las NT, 14.1 mg/L para las plantas RD1A, 22.1 mg/L para las RD1B y 20 mg/L para las RD1C (figura 18).

Al día ocho, en las plantas totalmente estresadas, las líneas RD1A y RD1B tuvieron un contenido mayor respecto al día cuatro (20.8 y 23.9 mg/L, respectivamente), mientras que se observó un contenido menor en las plantas RD1C y NT (17.5 y 19 mg/L, respectivamente), siendo las RD1B quienes presentaron un contenido más alto que todas las demás plantas (figura 18).

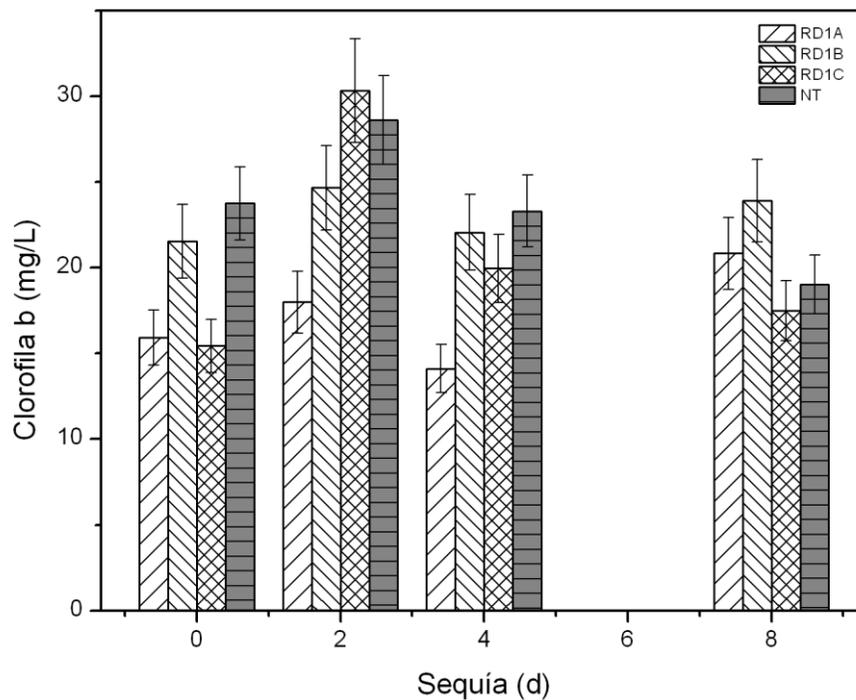


Figura 11. Contenido de clorofila b de las diferentes líneas de plantas de trigo a lo largo del tratamiento de sequía (n=3).

El contenido de clorofila total no mostró cambios importantes a lo largo del tratamiento de sequía, excepto en el día dos, donde todas las plantas tuvieron los niveles más altos (figura 19).

Al inicio del tratamiento, el contenido de clorofila total fue de 47.7 mg/L en las plantas NT, 43.4 mg/L en las RD1A, 46.4 mg/L en las RD1B y 39.8 mg/L en las RD1C (figura 19).

Al día dos, la clorofila total aumentó para todas las líneas, donde fueron las plantas NT las que mostraron el nivel más alto respecto a las tres líneas transformadas (56.6 mg/L) (figura 19).

En los días cuatro y ocho del tratamiento, los valores obtenidos para la clorofila total, tanto para las plantas transformadas como para las no transformadas, fueron similares a los que se tenían en las plantas sin estrés del día cero (figura 19).

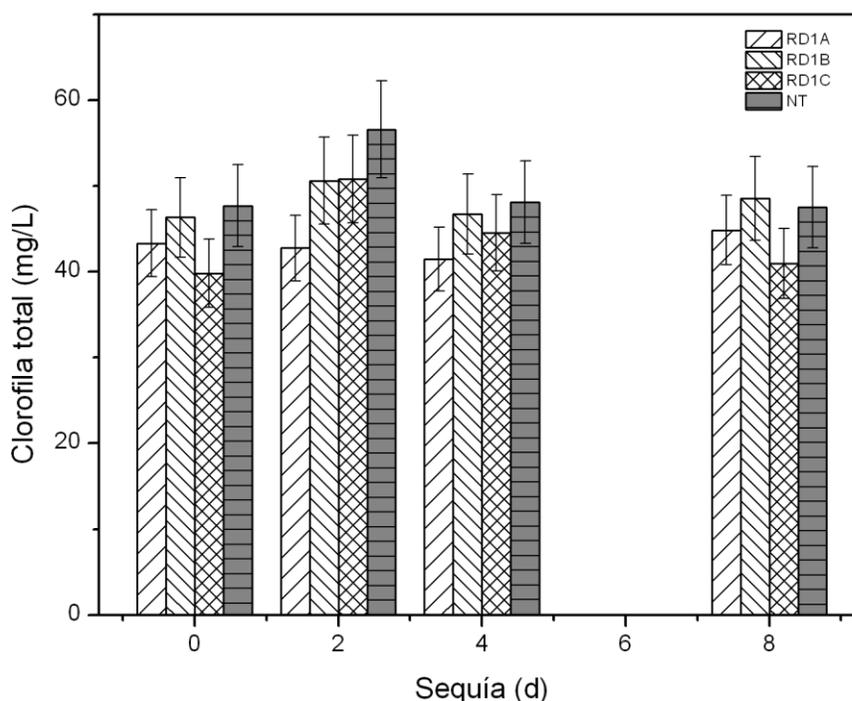


Figura 12. Contenido de clorofila total de las diferentes líneas de plantas de trigo a lo largo del tratamiento de sequía (n=3).

Las plantas de la línea RD1A tuvieron una recuperación de su contenido de clorofila a al cuarto día de estrés, mientras que las RD1C lo hicieron al día cuatro y las RD1B se recuperaron al segundo día y mantuvieron su nivel de clorofila a hasta el día

ocho. Las plantas NT mantuvieron su contenido de clorofila a en los primeros dos días de estrés y se observó que incluso al final del tratamiento, este fue mayor que en las otras líneas.

El contenido de clorofila b aumentó en todas las líneas al segundo día de estrés, disminuyendo al día cuatro y aumentando nuevamente al día ocho, lo que podría ser indicador de que las plantas se encontraban en estrés para el final del tratamiento.

En cuanto al contenido de clorofila total, se observó que fue mayor en las plantas NT que en las líneas transformadas excepto en el día ocho de estrés, donde la línea RD1B tuvo una recuperación de sus niveles de clorofila total teniendo el contenido más alto. La línea RD1A también tuvo una recuperación en el último día del tratamiento, mientras que esto solamente ocurrió en el día dos para las RD1C, las cuales para el día ocho tuvieron el menor contenido de clorofila total.

Lyu y col. (2013) encontraron cambios en el contenido de clorofila total en plantas de tomate en sequía similares a los encontrados en éste trabajo. Sin embargo dichos autores no midieron clorofila a o b, por lo que solo se puede comparar respecto a la clorofila total.

Parámetros Fotosintéticos

Tasa de Asimilación de CO₂

Para conocer la cantidad de CO₂ que estaba ingresando a la célula de la hoja, se midió la tasa de asimilación de CO₂ (A) durante el tratamiento de estrés. En las plantas NT, el valor de A disminuyó conforme aumentó el grado de sequía. Lo mismo ocurrió para las líneas de plantas RD1A, RD1B y RD1C; sin embargo, el valor de A siempre se mantuvo más alto en las líneas transformadas, incluso cuando las plantas se encontraban en sequía severa (figura 10).

Al día cero de estrés, la tasa de asimilación de CO₂ de las plantas NT fue de 17.2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, mientras que las plantas transformadas RD1A, RD1B y RD1C tuvieron valores dos veces más altos (35.5, 39.8 y 36.7 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, respectivamente) (figura 10).

En el segundo día el valor de A disminuyó a 12.6 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ en las plantas NT, 29.5 para las plantas RD1A, 24.3 para las RD1B y 23.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ para las RD1C. Al cuarto día, estos valores no presentaron grandes cambios, a excepción para las plantas

RD1C, en las cuales su asimilación de CO₂ fue menor que en las otras líneas de plantas (18.5 μmol m⁻² s⁻¹) (figura 10).

Al día ocho de sequía, cuando las plantas se encontraban en estrés severo, la tasa de asimilación de CO₂ fue de 4.4 μmol m⁻² s⁻¹ en las NT, mientras que en las líneas transformadas, dicho valor fue de 9.7 μmol m⁻² s⁻¹ en las plantas RD1A, 14 μmol m⁻² s⁻¹ en las RD1B y 5.4 μmol m⁻² s⁻¹ en las RD1C (figura 10).

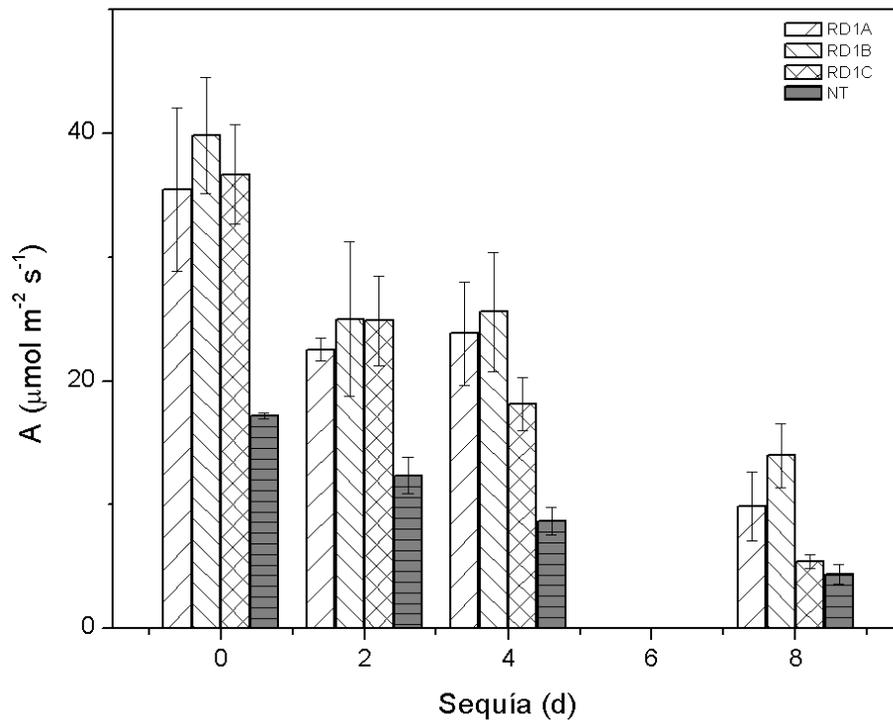


Figura 13. Tasa de asimilación de CO₂ de las diferentes líneas de plantas de trigo durante el estrés por sequía (n=7).

A pesar de que para el día ocho del tratamiento, la tasa de asimilación de CO₂ en las plantas transformadas había disminuido alrededor de cuatro veces respecto al día cero, fueron estas líneas las que tuvieron un valor de A mayor frente a las plantas NT.

Estos resultados muestran que las tres líneas de plantas de trigo transformadas poseen una mayor capacidad de asimilar CO₂ respecto a las no transformadas, tanto en condiciones de no estrés como de estrés, sin embargo, cuando la sequía fue más severa se observaron diferencias entre las líneas de plantas transformadas, donde fueron las

líneas RD1A y RD1B quienes tuvieron una tasa de asimilación de CO₂ más alta respecto a las RD1C.

Eficiencia de la Asimilación del CO₂

La eficiencia de la asimilación del CO₂ se calculó a partir de la relación entre la tasa de asimilación de CO₂ (A) y la concentración subestomática de CO₂ (Ci). En el día cero, aun cuando las plantas se encontraban sin estrés, la línea NT mostró una eficiencia de asimilación del CO₂ de 0.03, mientras que las plantas transformadas mostraron valores doblemente altos (0.05 para las RD1A, 0.06 para las RD1B y 0.06 para las RD1C) (figura 11).

Esta relación continuó al segundo día del tratamiento de sequía, donde las tres líneas de plantas transformadas nuevamente tuvieron valores de A/Ci dos o más veces mayores que el que presentaron las plantas NT (figura 11).

Al cuarto día de estrés, en las plantas NT el valor de A/Ci ya había disminuido a casi la mitad de lo que mostró en el día 0 (0.01), mientras que en las plantas transformadas, fue en este día cuando se obtuvo la eficiencia de asimilación de CO₂ más alta de todos los días del estrés (0.06, 0.08 y 0.07 para las RD1A, RD1B y RD1C, respectivamente) (figura 11).

Para el final del tratamiento, se observó una disminución en el valor de A/Ci, obteniéndose los valores más bajos para las cuatro líneas de plantas de todos los días del tratamiento; sin embargo, aun en sequía severa las tres líneas de plantas transformadas RD1A, RD1B y RD1C, tuvieron una eficiencia de asimilación de CO₂ mayor que las plantas NT (0.01), donde la línea RD1B tuvo un valor dos veces más alto que las NT (0.03) (figura 11).

Mientras que la asimilación de CO₂ disminuyó en las plantas NT conforme aumentó el estrés por sequía, se observó que las plantas transformadas mantuvieron su eficiencia durante los primeros cuatro días del tratamiento de estrés. A pesar de que para el final del tratamiento este valor disminuyó incluso a menos de la mitad de lo que mostraron al día cero, las plantas transformadas tuvieron un valor de A/Ci más alto que las NT, indicando que aún en sequía severa, dichas plantas continuaban fijando CO₂ para llevar a cabo su actividad fotosintética.

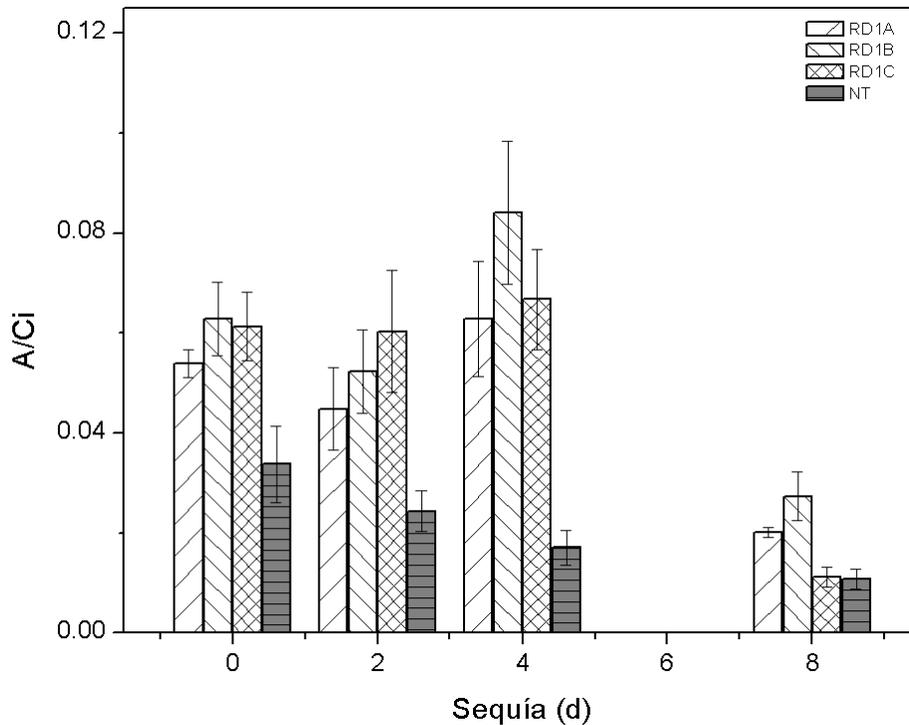


Figura 14. Eficiencia de la asimilación del CO₂ de las diferentes líneas de plantas de trigo durante el estrés por sequía (n=7).

Existen pocos estudios sobre parámetros fotosintéticos en plantas transformadas con genes para síntesis de trehalosa, sin embargo, los resultados encontrados en este trabajo coinciden con los reportados por Lyu y col. (2013), quienes transformaron plantas de tomate con una enzima bifuncional para síntesis de trehalosa, donde encontraron una mayor tasa de asimilación de CO₂ en las plantas transformadas.

Eficiencia del Uso del Agua

Para calcular la eficiencia del uso del agua de las plantas de trigo sometidas a estrés, se hizo una relación entre la tasa de transpiración (E) y la tasa de asimilación de CO₂ (A).

En el día cero del tratamiento, cuando las plantas no se encontraban en estrés por sequía, no había diferencia en la eficiencia del uso del agua entre las plantas NT y las plantas de las líneas transformadas RD1A, RD1B y RD1C, donde las cuatro líneas mostraron un valor de A/E de alrededor de 0.3 (figura 12).

Al segundo día del estrés, el valor para A/E disminuyó ligeramente para las tres líneas de plantas transformadas, mientras que para las plantas NT continuó casi igual que en el día 0 (figura 12).

Al cuarto día, las plantas transformadas RD1A, RD1B y RD1C tuvieron los valores más altos para la eficiencia del uso del agua (3.5, 3.8 y 4.7, respectivamente), observando un aumento del triple respecto al que mostraron en el día 0 de estrés; en las plantas NT, aunque el aumento no fue tan marcado como para las plantas transformadas, el valor de A/E también incrementó (figura 12).

Para el final del tratamiento de sequía, la eficiencia de uso del agua disminuyó aproximadamente un 50% menos de lo que había en el día 4. En la línea NT este valor, incluso a pesar de que las plantas ya estaban severamente estresadas, continuó aumentando. A pesar de esto, las plantas transformadas tuvieron un A/E mayor que las NT, donde fue la línea RD1B la que tuvo el valor de A/E más alto (figura 12).

Como se observa en la figura 12, a pesar del progresivo aumento en el estrés por sequía, fueron a los días cuatro y ocho donde las plantas, tanto NT como transformadas, mostraron una eficiencia del uso del agua más alta respecto a los días anteriores. Este valor disminuyó para el final del tratamiento, sin embargo, no parece haber diferencias en la eficiencia de uso del agua entre las plantas transformadas y las no transformadas cuando estas se encontraban en estrés alto.

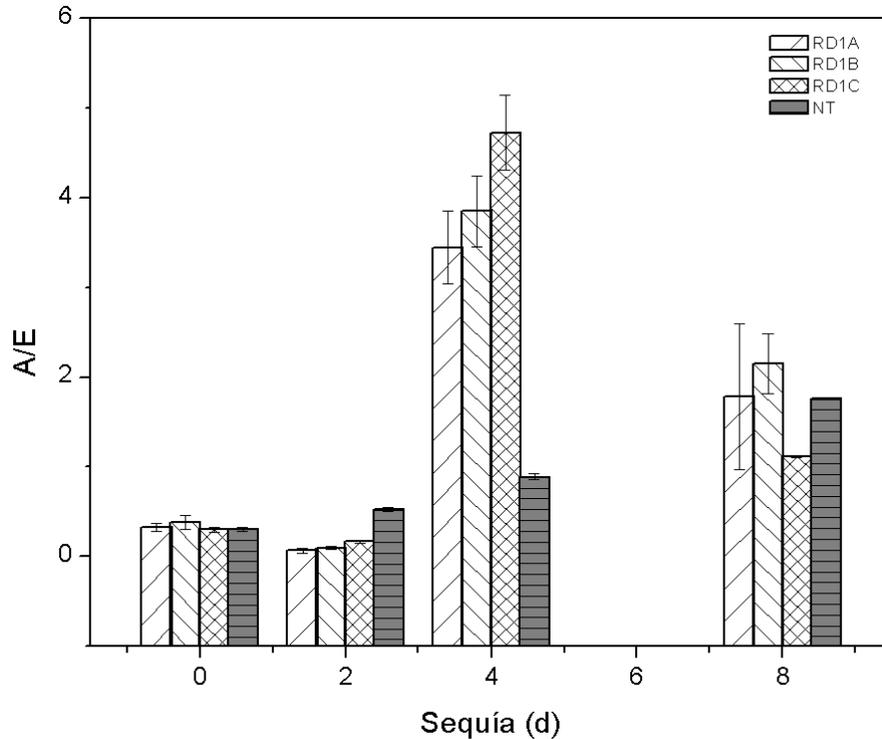


Figura 15. Eficiencia del uso del agua de las diferentes líneas de plantas de trigo durante el estrés por sequía (n=7).

La disminución en la eficiencia en el uso de agua observada puede relacionarse con la alta tasa de transpiración encontrada en las plantas transformadas, ya que esta es una de las consecuencias de la apertura estomática ocurrida para que el intercambio gaseoso pueda darse y el CO_2 entre a células de las hojas.

Puesto que las plantas de las líneas transformadas tuvieron una mayor tasa de asimilación de CO_2 , su apertura estomática continuó durante la sequía severa y, por lo tanto, tuvieron una mayor tasa de transpiración, lo que se refleja en una disminución en la eficiencia del uso del agua. En cambio, aunque en las plantas NT se observa una mejora en la eficiencia del uso del agua conforme a los días, su tasa de asimilación de CO_2 disminuyó, lo que indica que conforme aumentó el grado de sequía los estomas se cerraron para evitar la pérdida de agua, impidiendo la entrada de CO_2 a las células.

Los resultados obtenidos para los parámetros fotosintéticos sugieren que las plantas transformadas mantuvieron una fotosíntesis más eficiente aun cuando el agua no estuvo disponible, lo que demuestra que la transformación hizo a las plantas capaces de sobrevivir aun en condiciones de estrés.

Actividad de Hexocinasa

La actividad de la enzima hexocinasa en las plantas NT aumentó durante los primeros días de estrés, incrementando casi diez veces al día 4 del tratamiento respecto a la planta sin estrés (20.9×10^{-3} $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína); sin embargo al día 8 esta actividad disminuyó nuevamente al nivel del control sin estrés (1.9×10^{-3} $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) (figura 13).

En las plantas transformadas RD1A, la actividad de hexocinasa al día cero de estrés fue de 1.3×10^{-3} $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína; la actividad disminuyó al día dos respecto al control (4.81×10^{-3} $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína). Para el día cuatro la actividad de hexocinasa aumentó a 12.11×10^{-3} $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína y disminuyó nuevamente a 2.46×10^{-3} $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína para el día 8 (figura 13).

Las plantas RD1B tuvieron una actividad de hexocinasa de 31.82×10^{-3} $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína al día cero de estrés, la cual al día dos disminuyó a 1.37×10^{-3} y hasta a 1×10^{-4} $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ al día cuatro y, al octavo día, la actividad no mostró cambios (figura 13).

En la línea RD1C, la actividad de hexocinasa inicialmente fue de 4.94×10^{-3} $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína; al segundo día, la actividad fue 3.93×10^{-3} $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$, mientras que al cuarto día de estrés, no se detectó actividad; sin embargo, al día ocho las plantas recuperaron la actividad de hexocinasa (2.97×10^{-3} $\mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) (figura 13).

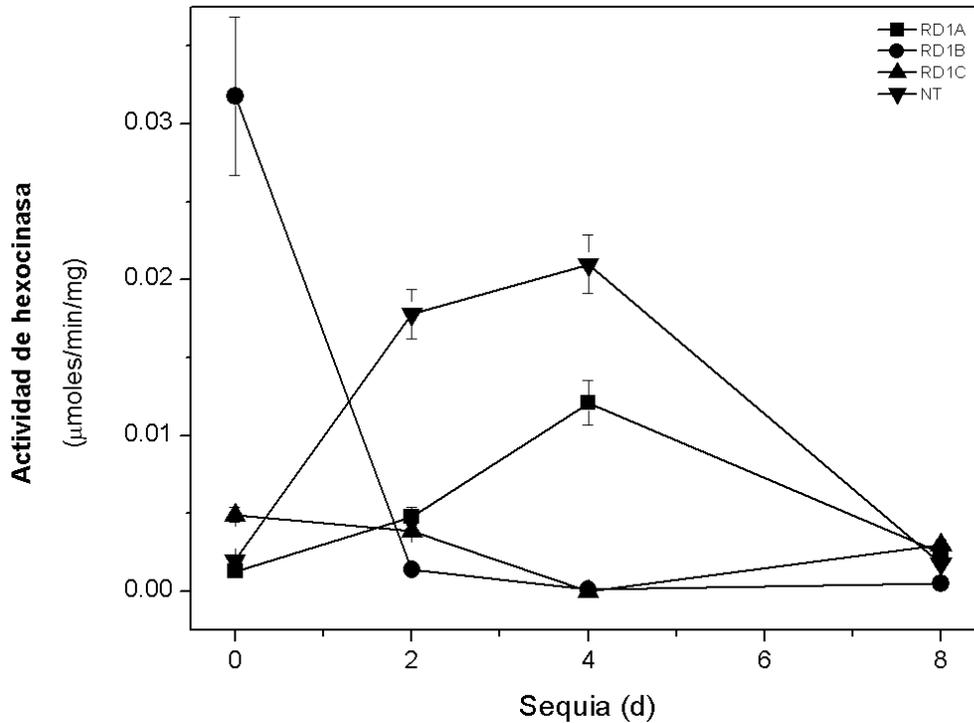


Figura 16. Actividad de hexocinasa en las diferentes líneas de plantas durante la sequía (n=3) .

La actividad de hexocinasa fue mayor en todas las plantas transformadas que en las plantas NT cuando estas se encontraban sin estrés (día cero); sin embargo, para el segundo y cuarto día, fueron las NT quienes presentaron una mayor actividad. Esta se perdió al día ocho, cuando las plantas estaban totalmente estresadas. Aunque todas las plantas transformadas conservaron la actividad incluso al octavo día de estrés, fueron las de la línea RD1B quienes mostraron una actividad mayor tanto al inicio como al final del tratamiento.

Los valores para la actividad de hexocinasa sugieren que las plantas no transformadas agotaron su fuente de energía en los días dos y cuatro del tratamiento de estrés, mientras que en las plantas transformadas, la baja actividad de hexocinasa podría ser un indicador de que los azúcares sintetizados en el ciclo de Calvin pudieron dirigirse a la síntesis de trehalosa y no a ser utilizados como fuente de energía vía glucólisis.

Actividad de Trehalosa-6-fosfato Sintasa

Al inicio del tratamiento de sequía, no se presentó gran diferencia en la actividad de trehalosa-6-fosfato sintasa entre las diferentes líneas, tanto transformadas como NT y, al día dos de estrés, todas las plantas mostraron comportamientos similares. Sin embargo, al cuarto día, la actividad de TPS fue mayor en las plantas NT que en las tres líneas transformadas; a pesar de esto, al octavo día, cuando las plantas se encontraban totalmente estresadas, las plantas NT perdieron su actividad de TPS y fueron las plantas transformadas de la línea RD1B las que mostraron la actividad más alta (figura 14).

Las plantas NT tuvieron una actividad de trehalosa fosfato sintasa de 85.9×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína en el día cero, 63.6×10^{-3} en el día 2 y 11.8×10^{-2} en el día cuatro; al último día del tratamiento, ya no se detectó actividad (figura 14).

La actividad de TPS en las plantas transformadas RD1A disminuyó progresivamente durante el tratamiento. Al día cero, fue de 17.7×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína, mientras que al día dos, cuatro y ocho tuvieron valores de 10.8×10^{-3} , 10.5×10^{-3} y 6.5×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína, respectivamente (figura 14).

En las plantas RD1B al día cero, la actividad fue de 10.8×10^{-2} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína; esta aumentó a 11.3×10^{-3} en el día dos y a 22.6×10^{-3} en el día cuatro; al último día del tratamiento, la actividad de TPS se mantuvo respecto al día cuatro (23.4×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína) (figura 14).

En la línea RD1C, la actividad fue de 61.4×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína en el día cero, la cual disminuyó para el segundo y cuarto día, a 60.3×10^{-3} y 44.9×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína, respectivamente; al octavo día, se observó una recuperación de la actividad de TPS de hasta 56.5×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína (figura 14).

La actividad de TPS mostró valores más altos para las plantas NT que para las transformadas durante los primeros cuatro días de estrés. Sin embargo, conforme aumentó la sequía, las plantas de las líneas transformadas mostraron una recuperación de la actividad de TPS, manteniéndose al día ocho del estrés, donde las plantas NT ya no mostraban actividad. De estas, fue la línea RD1C quien conservó mejor la actividad de TPS a lo largo del estrés, incluso en la sequía severa (figura 14).

Según estos resultados, la actividad de TPS se mantuvo durante el estrés severo en las plantas transformadas, mientras que las no transformadas perdieron su actividad. Esto puede ser un indicador de que debido a la transformación, las plantas sintetizaron trehalosa a pesar del grado de sequía. Dado que las plantas de trigo se transformaron con

un promotor inducible por sequía, los datos obtenidos para la actividad de TPS muestran que probablemente la actividad cuantificada en este experimento durante los primeros cuatro días, no corresponde a la de la enzima bifuncional, por lo que se recomienda realizar más estudios al respecto para comprobar esto.

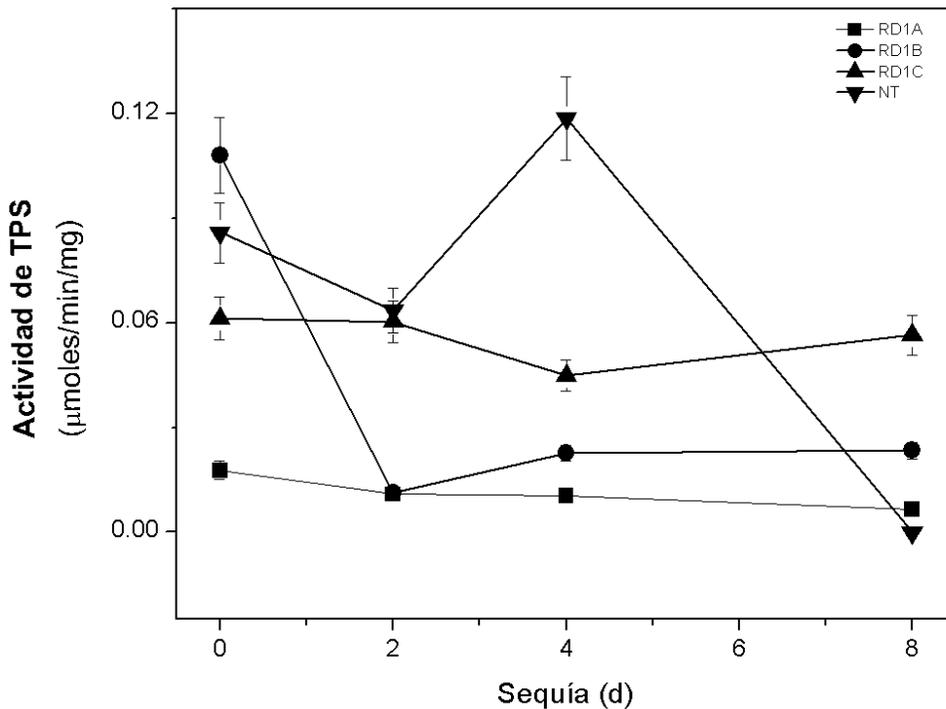


Figura 17. Actividad de TPS en las diferentes líneas de plantas durante la sequía (n=3).

Actividad de Trehalasa

La actividad de trehalasa fue más alta en las líneas de plantas transformadas que en las plantas NT durante todos los días del tratamiento. Se observó un decremento en la actividad de trehalasa en los días 2 y 4 del tratamiento, respecto al día cero, excepto para las plantas de la línea RD1C, en las cuales al cuarto día de sequía nuevamente aumentó la actividad enzimática. Al día ocho, en las plantas de la línea RD1A se observó una recuperación de la actividad de trehalasa, aun cuando estas se encontraban en estrés severo (figura 15).

En las plantas NT, la actividad de trehalasa fue de 6.7×10^{-3} µmoles/min/mg de proteína al día cero, la cual aunque disminuyó en el día dos, al cuarto día nuevamente

aumentó a 2.3×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína y a 3.6×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína en el día ocho (figura 15).

En las plantas transformadas RD1A se encontró una actividad de trehalasa de 5.4×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína en el día cero, teniendo la actividad más alta al día dos (13.6×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína), puesto que al día cuatro esta decayó; sin embargo, al día ocho se observó una recuperación de la actividad de trehalasa alcanzando nuevamente el nivel del día cero (5.8×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína) (figura 15).

Las plantas RD1B tuvieron la actividad de trehalasa más alta en el día cero (13.6×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína), ya que esta disminuyó notablemente para el segundo día de sequía (2.9×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína); en el cuarto día del tratamiento nuevamente aumentó la actividad, la cual se mantuvo sin muchos cambios aun en el día ocho (4.6×10^{-4} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína) (figura 15).

En la línea RD1C, la actividad fue de 7.2×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína al día cero, la cual aumentó progresivamente durante el segundo y cuarto día del tratamiento; para el octavo día de sequía, a pesar de que se observó una disminución en la actividad, esta fue mayor que en las plantas no estresadas (8.4×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína) (figura 15).

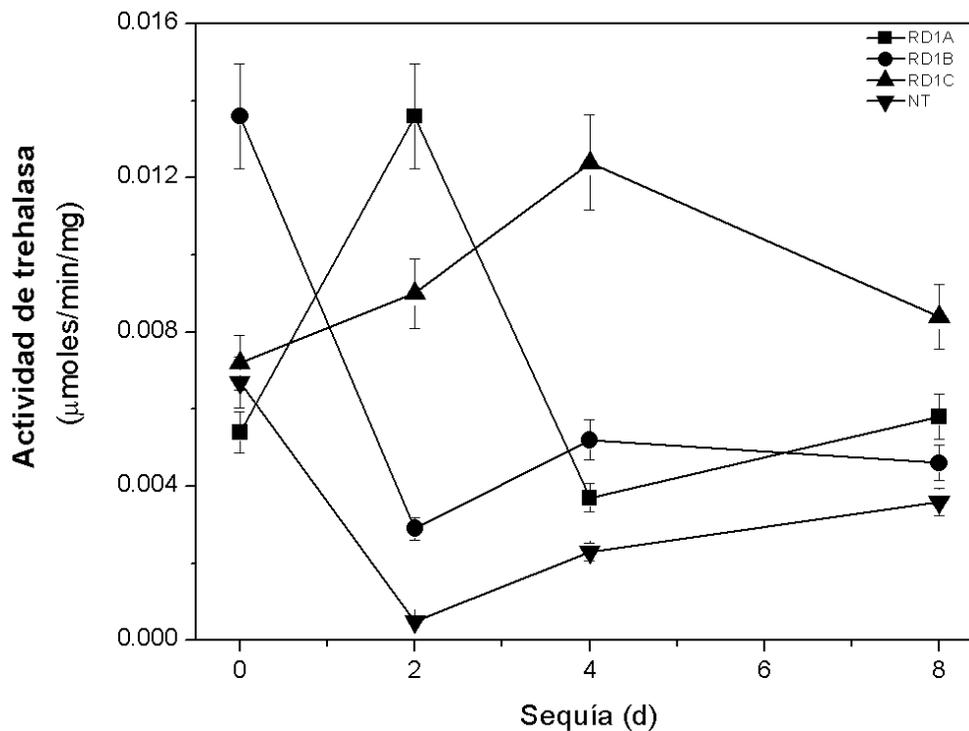


Figura 18. Actividad de trehalasa en las diferentes líneas de plantas durante la de sequía (n=3).

Estos resultados muestran que la síntesis de trehalosa fue mayor en las plantas transformadas durante todo el tratamiento. Lo anterior puede ser consecuencia de la expresión de la enzima bifuncional para síntesis de trehalosa, haciendo que este disacárido estuviera presente en mayor cantidad en las líneas transformadas que en las NT. Además, es posible que la presencia de esta molécula haya tenido impacto en las plantas transformadas, haciéndolas más resistentes a la sequía severa, ya que fueron estas plantas quienes mantuvieron mejor su actividad enzimática.

Actividad de Betaína Aldehído Deshidrogenasa

La actividad enzimática de la betaína aldehído deshidrogenasa tuvo un comportamiento similar entre las líneas NT, RD1B y RD1C durante los primeros cuatro días del tratamiento de estrés, mientras que para las plantas RD1A, la actividad fue notablemente más alta. Sin embargo, al día ocho del estrés por sequía, la actividad de BADH fue similar en las líneas transformadas RD1A, RD1B y RD1C, mientras que las plantas NT ya no presentaron actividad (figura 16).

La BADH en las plantas NT no estresadas tuvo una actividad de 18.9×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína, la cual disminuyó a menos de la mitad de la actividad inicial para el segundo día de estrés (7.5×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína); a pesar de que para el cuarto día la actividad seguía presente, al día ocho, cuando las plantas estaban totalmente estresadas, no se encontró actividad de la enzima BADH (figura 16).

En la línea de plantas transformadas RD1A, inicialmente la actividad de BADH fue de 7.8×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína, la cual tuvo un aumento para los días dos y cuatro del tratamiento (72.7×10^{-3} y 79.5×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína, respectivamente). No obstante, para el final de los días de estrés, la actividad disminuyó nuevamente casi a nivel de las plantas sin estresar (41.2×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína) (figura 16).

La BADH en las plantas RD1B al día cero, tuvo una actividad de 31.6×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína. Esta disminuyó notablemente al segundo día, pero en el cuarto día se observó un ligero aumento que continuó hasta el día ocho (2×10^{-3} y 3.3×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína, respectivamente) (figura 16).

En las plantas de la línea RD1C, la actividad de BADH aumentó del día cero (8.6×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína) a los días dos y cuatro del tratamiento (13.3×10^{-3} y 11.9×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína, respectivamente), incrementando su valor cuatro veces respecto al día cero en el día ocho, donde las plantas estaban totalmente estresadas (38.5×10^{-3} $\mu\text{moles/min/mg}$ de proteína) (figura 16).

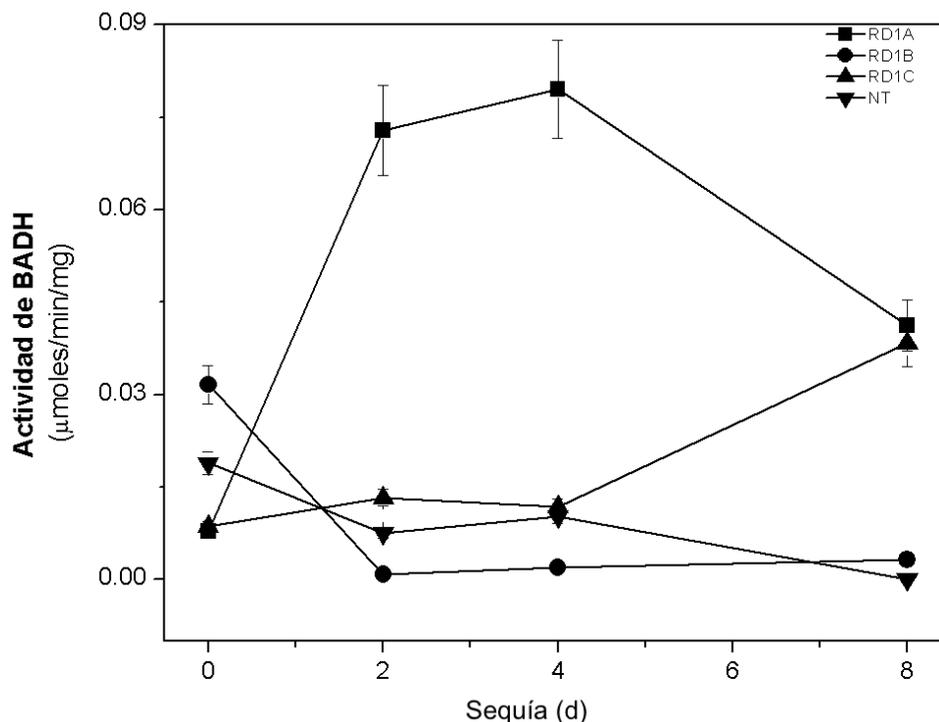


Figura 19. Actividad de BADH en las diferentes líneas de plantas durante la sequía (n=3).

Durante los primeros cuatro días del tratamiento, las líneas RD1A y RD1C tuvieron una actividad de BADH más alta que las plantas NT, pero en el día ocho se observó un aumento de esta en la línea RD1B.

La actividad de BADH disminuyó progresivamente en las plantas NT a lo largo de los días de sequía, mientras que en las tres líneas de plantas transformadas se mantuvo alta incluso al octavo día, donde estas se encontraban altamente estresadas. De acuerdo con los datos obtenidos, se sugiere que las plantas de trigo bajo condiciones de sequía son capaces de inducir la actividad de BADH y, por lo tanto, acumular glicina betaína como osmolito para enfrentar el estrés por sequía.

Estos resultados sugieren que las plantas transformadas enfrentaron más efectivamente el estrés por sequía que las plantas NT, no solo por el aumento en la síntesis de trehalosa, sino también por la síntesis y acumulación de otros osmolitos como la glicina betaína.

Las plantas de la línea NT tuvieron una menor retención del contenido relativo de agua, pero no mostraron cambios en su contenido de clorofila a, b y total y su eficiencia del uso del agua aumentó a lo largo del tratamiento. Sin embargo, aunque la actividad de trehalasa aumentó, su asimilación de CO₂ y la actividad enzimática de hexocinasa se vieron severamente afectada y se perdió la actividad de TPS y BADH.

En las plantas transformadas de la línea RD1A, se observó que en estrés severo hubo una pérdida de agua casi a nivel de las NT, el contenido de clorofila a disminuyó, mientras que la clorofila b y total aumentaron. La eficiencia del uso del agua disminuyó conforme aumentaron los días de estrés, así como la eficiencia en la asimilación de CO₂. La actividad de las enzimas TPS y hexocinasa disminuyeron mientras que la actividad de trehalasa aumentó y fue en esta línea donde se encontró la actividad más alta de BADH para el final del tratamiento de sequía.

Las plantas de la línea RD1B perdieron su contenido relativo de agua conforme aumentaron los días de estrés, sin embargo, la eficiencia del uso del agua aumentó y no mostraron cambios en su contenido de clorofila a, b y total; además, aunque la eficiencia de la asimilación de CO₂ disminuyó progresivamente, fue esta la línea que mostró un valor más alto respecto a las demás cuando la sequía era severa. No obstante, la actividad de hexocinasa, TPS, trehalasa y BADH fue menor conforme aumentó el grado de estrés.

En la línea transformada RD1C, el estrés por sequía en las plantas se vio reflejado con mayor pérdida de su contenido relativo de agua conforme el paso de los días. Los niveles de clorofila a no mostraron muchos cambios, la clorofila b aumentó y aunque la clorofila total había aumentado para el día dos, para el final del tratamiento disminuyó. La eficiencia de asimilación de CO₂ y la eficiencia del uso del agua disminuyeron al aumentar los días de sequía, obteniendo los valores más bajos entre todas las líneas. Sin embargo, la actividad de las enzimas hexocinasa, TPS y trehalasa se mantuvo para el final del tratamiento mientras que la actividad de BADH aumentó.

Los resultados sobre el CRA de las diferentes plantas muestran evidencia del impacto que tuvo la deficiencia de agua en las plantas no transformadas, quienes perdieron su CRA en mayor medida frente a las plantas transformadas. Esto indica que la síntesis de trehalosa mejoró la retención de agua en las plantas transformadas, quienes conservaron mejor su CRA cuando la sequía era alta.

El estrés por sequía no tuvo impacto en los niveles del contenido de clorofila a, b y total en las plantas de trigo. La tasa de asimilación de CO₂ fue mayor y más eficiente en dos de las tres líneas de plantas transformadas que en las no transformadas, mientras

que la eficiencia en el uso del agua disminuyó en las plantas no transformadas conforme aumentó la severidad del estrés, mientras que en las plantas transformadas fue más alta. Esto es indicador de que a pesar de que aparentemente la sequía no tuvo impacto en el contenido de clorofilas y, por lo tanto, en la asimilación de luz, los resultados sobre la asimilación y fijación del CO_2 indican que la fotosíntesis fue mejor en las plantas transformadas que en las no transformadas.

La actividad de las enzimas hexocinasa, trehalosa fosfato sintasa y trehalasa en las plantas no transformadas indicó un claro impacto de la sequía sobre su metabolismo. En las plantas transformadas, hubo una baja actividad de hexocinasa y una mayor actividad de TPS y trehalasa, lo que indica que la transformación con la enzima para síntesis de trehalosa estuvo activa durante los días de estrés y mejoró su resistencia ante la sequía. La BADH se mantuvo con mayor eficiencia en las plantas transformadas cuando estas se encontraban en estrés, lo que también podría ser consecuencia de la transformación, haciendo que las plantas transformadas enfrentaran mejor el estrés no solo por mejoras en su metabolismo del carbono, sino también por la síntesis de osmolitos como la glicina betaína.

CONCLUSIONES

Se concluye que la transformación con la enzima bifuncional TPS-TPP para síntesis de trehalosa tuvo un impacto en el metabolismo del carbono y en la respuesta a estrés por sequía de las plantas de trigo transformadas, permitiéndoles enfrentar la sequía de manera más eficiente y con ello sobrevivir al estrés.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Basurto M., Núñez A., Pérez R., Hernández OA. 2008. Fisiología del estrés ambiental en plantas. Facultad de Ciencias Agrotecnológicas, Universidad Autónoma de Chihuahua. Chihuahua, México.

Bidwell RGS. 1979. Fisiología vegetal. AGT Editores, 1era edición. Ontario, Canadá.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Budak H., Kantar M., Kurtoglu KY. 2013. Drought tolerance in modern and wild wheat. *The Scientific World Journal*, vol. 2013. 16 p.

Cabral-Torres FA. 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.

Cortina C., Culiáñez-Macià FA. 2005. Tomato abiotic stress enhanced tolerance by trehalose biosynthesis. *Plant Science.* vol. 169: 75-82.

Cossani CM, Reynolds MP. 2012. Physiological traits for improving heat tolerance in wheat. *Plant Physiol.* 160(4): 1710-1718.

Dai N., Schaffer A., Petreikov M., Shahak Y., Giller Y., Ratner K., Levine A., Granot D. 1999. Overexpression of Arabidopsis hexokinase in tomato plants inhibits growth, reduces photosynthesis and induces rapid senescence. *The Plant Cell*, Vol. 11: 1253-1266.

Dixon J., Braun HJ., Kosina P., Crouch J. 2009. Wheat Facts and Futures 2009. México, D.F.: CIMMYT.

Fischer RA. 2011. Wheat physiology: a review of recent developments. *Crop & Pasture Science*. Vol. 62: 95-114.

Flexas J., Medrano H. 2002. Drought-inhibition of photosynthesis in C3 plants: stomatal and non-stomatal limitations revisited. *Annals of Botany*. Vol. 89: 183-189.

García-Murria MJ. 2006. Regulación redox de la Rubisco: contribución estructural y funcional del par de residuos conservados Cys172 y Cys192. Tesis de Doctorado. Universitat de Valencia, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Valencia, España.

Garg A., Kim J., Owens TG., Ranwala AP., Choi YD., Kochian LV., Wu RJ. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *PNAS*. 99(25): 15898-15903.

Granot D., Kelly G., Stein O., David-Scwartz R. 2014. Substantial roles of hexocinase and fructokinase in the effects of sugar on plant physiology and development. *Journal of Experimental Botany* 65(3): 809-819.

Gutiérrez-Rodríguez M, Reynolds MP, Escalante JA, Larqué-Saavedra A. 2004. Algunas consideraciones en la relación entre fotosíntesis y el rendimiento de grano en trigo. *Ciencia Ergo Sum*. 12(2): 149-154.

Guzman-Partida AM., Valenzuela-Soto E.M. 1997. Porcine kidney betaine aldehyde dehydrogenase: purification and properties. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B* 119: 485-491.

Horton HR, Moran LA, Scrimgeour KG, Perry MD, Rawn JD. 2008. Principios de Bioquímica. 4ta edición. México. Pearson Educación. 976 p.

Hottiger T., Scmutz P., Wiemken A. 1987. Heat-induced accumulation futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 169: 5518-5522.

Jang IC., Oh SJ., Seo JS., Choi WB., Song SI., Kim CH., Kim YS., Seo HS., Choi YD., Nahm BH., Kim JK. 2003. Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth. *Plant Physiology*. Vol. 131: 516-524.

Juárez ZN., Bárcenas-Pozos ME., Hernández LR. 2014. El grano de trigo: características generales y algunas problemáticas y soluciones a su almacenamiento. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*. Vol. 8: 79-93.

Lehninger AL., Nelson DL., Cox MM. 2006. *Principios de Bioquímica*. 4ta edición. Editorial Omega.

Lichtenhaler HK. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.

Lyu JI., Min SR., Lee JH., Lim YH., Kim JK., Bae CH., Liu JR. 2012. 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: 257-162.

Mascorro JO., Avonce N., Iturriaga G. 2005. Biotecnología de la trehalosa en plantas. *Revista Chapingo, Serie Horticultura*. 11(2): 193-202.

Miralles DJ., Gonzáles FG., Abeledo LG., Serrago RA., Alzueta I., García GA., De San Caledonio RP., Lo Valvo P. 2014. *Manual de trigo y cebada para el cono sur: procesos fisiológicos y bases de manejo*. 1ª Edición. Buenos Aires, Argentina.

Miranda JA., Avonce N., Suárez R., Thevelein JM., Van Dijck P., Iturriaga G. 2007. A bifunctional TPS-TPP enzyme from yeas confers tolerance to multiple and extreme abiotic-stress conditions in transgenic *Arabidopsis*. *Planta*. 226:1411-1421.

Müller J., Zie ZP., Staehelin C., Boller T., Wiemken A. 1994. Effects of nitrate on accumulation of trehalose and other carbohydrates and on trehalase activity in soybean root nodules. *J. Plant Physiol.* 143: 153-160.

Muñoz RA., Velasco R. 2004. Genio y figura de la betaína aldehído deshidrogenasa. *Mensaje Bioquímico*, 28: 203-219.

O' Donnelly K., Zhao G., Patel P., Butt MS., Mak LH., Kretschmer S., Woscholski R., Barter L. 2014. Isolation and kinetic characterisation of hydrophobically distinct populations of form I Rubisco. *Plant Methods* 2014 (10):17.

Papageorgiou GC., Murata N. 1995. The unusually strong stabilizing effects of glycine betaine on the structure and function of the oxygen-evolving Photosystem II complex. *Photosynth Res.* 44(3): 243-52.

Parry M., Andraloljc PJ., Khan S., Lea PJ., Keys AJ. 2002. Rubisco activity: effects of drought stress. *Annals of Botany* 89: 833-839.

Paul MJ., Primavesi LF., Jhurrea D., Zhang Y. 2008. Trehalose metabolism and signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 417-441.

Producción Mundial de Trigo (2016). Cosecha en 2015. Disponible en: <https://www.produccionmundialtrigo.com/>

Racker E. 1962. *Methods in Enzymology* V. 266-270.

Raines CA. 2011. Increasing photosynthetic carbon assimilation in C3 plants to improve crop yield: current and future strategies. *Plant Physiol.* 155(1): 36-42.

Singhal GS., Renger G., Sopory SK., Irrgang KD., Govindjee. 1999. *Concepts in photobiology: photosynthesis and photomorphogenesis*. Springer Science. 1era edición.

Slavik. 1974. Methods of standyng plant water relation. Academy Publishing House. The Czechoslovak Academy of Science. p. 146.

Soñanez-Organis JG., Peregrino-Uriarte AB., Sotelo-Mundo RR., Forman HJ., Yépiz-Plascencia G. 2011. Hexocinase from the white shrimp *Litopenaeus vannamei*: cDNA sequence, structural protein model and regulation via HIF-1 in response to hypoxia. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 158: 242-249.

Streit NM., Canterle LP., Weber M., Hycheki LH. 2005. As clorofilas. Ciência Rural 35(3): 748-755.

Suárez R., Calderón C., Iturriaga G. 2009. Enhanced tolerance to multiple abiotic stresses in transgenic alfalfa accumulating trehalose. Crop Science. Vol. 49: 1791-1799.

Suárez R., Raya JC., Iturriaga G. 2015. La trehalosa: un azúcar osmoprotector con capacidad de señalización. Ciencia y Tecnol. Agrop. México. 3: 1-13.

Valenzuela-Avendaño JP., Valenzuela-Soto EM. 2009. Trehalosa, el azúcar de la resurrección. Ciencia y Desarrollo 35: 58-65.

Valenzuela-Avendaño JP. 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.

Yellisetty V., Reddy LA., Mandapaka M. 2015. In planta transformation of sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) using TPS1 gene for enhancing tolerance to abiotic stress. Journal of Genetics. 94(3): 425-434.

Yeo ET., Kwon HB., Han SE., Lee JT., Ryu JC., Byun MO. 1999. Molecules and Cells. 10(3): 263-268.