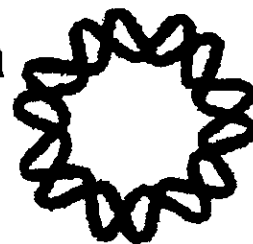




Instituto de Biotecnología
Universidad Nacional Autónoma
de México



00551
9

"Análisis de Plantas Transgénicas de *Arabidopsis thaliana* que sobreexpresan el gen *SITPS1* de *Selaginella lepidophylla*"

2880004

T E S I S

que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias Bioquímicas

presenta

Ma. Rosa Elia Figueroa Balderas

Cuernavaca, Mor., 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio del Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente, del Departamento de Biología Molecular de Plantas, del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Gabriel Iturriaga de la Fuente. Durante la realización de este trabajo, se contó con el apoyo económico de la beca 118120 del CONACyT.

Indice General

	Página
Indice de Figuras	iii
Indice de Tablas	v
Resumen	1
1.- Introducción	2
2.- Antecedentes	5
2.1 Estrés en Plantas	5
2.1.1 Estrategias de Resistencia al Estrés Hídrico	7
2.1.2 Adaptación de las Plantas al Déficit Hídrico	8
2.2 Trehalosa	11
2.2.1 Metabolismo de trehalosa en Microorganismos	13
2.2.2 Metabolismo de trehalosa en plantas	15
2.2.3 Papel de la trehalosa en simbiosis	16
2.2.4 toxicidad de la trehalosa y alteraciones en el desarrollo	17
2.3 Modelo de Estudio: <i>Arabidopsis thaliana</i>	18
2.3.1 La Planta	18
2.3.2 Organización y tamaño del genoma	19
2.3.3 Transformación de <i>Arabidopsis</i>	20
2.3.4 ¿Porqué <i>Arabidopsis</i> ?	21
3.- Objetivos	22
4.- Materiales y Métodos	23
4.1 Material Vegetal y Condiciones de Cultivo	23
4.2 Medios y Soluciones	23
4.3 Construcción de plásmidos y obtención de plantas transgénicas	24
4.3.1 Método y Condiciones de transformación mediado por <i>Agrobacterium</i>	25
4.3.2 Selección de Homocigas	26
4.4 Manipulación de DNA	26
4.5 Amplificaciones de PCR	28
4.6 Amplificaciones de RT-PCR	28
4.7 Pruebas de estrés salino y osmótico	29

4.8 Pruebas de termotolerancia y choque térmico	30
4.9 Determinación del contenido de trehalosa	30
5.- Resultados y Discusión	31
5.1 Clonación del cDNA <i>SITPS1</i> de <i>Selaginella lepidophylla</i> y movilización hacia <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	31
5.2 Transformación con el cDNA <i>SITPS 1</i> de <i>Selaginella lepidophylla</i>	37
5.3 Análisis molecular de plantas transgénicas	37
5.4 Alteraciones Morfológicas	41
5.5 Acumulación de trehalosa en presencia de Validamicina A	45
5.6 Efectos del estrés salino y osmótico	49
5.7 Efectos a baja temperatura y choque térmico	51
6.- Conclusiones	53
7.- Bibliografía	54

Índice de Figuras

Figura	Página	
2.1	Diferentes factores de estrés ambiental, resultando en estrés abiótico	6
2.2	Respuestas de las plantas al déficit hídrico	9
2.3	Representación diagramática del porqué el metabolismo del carbono es Integrador maestro de la influencia de estresores sobre la fisiología de la planta	10
2.4	Estructura de la trehalosa	12
2.5	Esquema de biosíntesis de trehalosa en levadura	13
2.6	Esquema de biosíntesis de trehalosa en bacterias	14
2.7	Esquema de acción de: a) Trehalasa; b) trehalosa fosforilasa	15
2.8	<i>Selaginella lepidophylla</i> a) hidratada; b) deshidratada	16
2.9	Planta de <i>Arabidopsis thaliana</i>	19
4.1	Esquema de transformación al vacío de <i>A. thaliana</i>	26
4.2	Esquema de selección de líneas homocigas	27
5.1	Estrategia de clonación del promotor 35S en el pBin19-NOS	32
5.2	Estrategia de clonación de <i>SITPS 1</i> en pBin35SNOS	33
5.3	Estrategia de clonación del Δ <i>NSITPS 1</i> en el pBin35SNOS	34
5.14	Análisis por restricción de las construcciones: a) llevando el gene completo (<i>SITPS 1</i>); b) llevando el gene con la delección (Δ <i>NSITPS 1</i>)	35
5.15	Fragmentos esperados por restricción después de la movilización de las construcciones hacia <i>Agrobacterium</i> .	36
5.6	Patrón de restricción de la construcción con <i>SITPS 1</i>	36
5.7	Oligos internos en el gene <i>SITPS 1</i> y Δ <i>NSITPS 1</i>	38
5.8	Oligos utilizados en el plásmido control (pBin35S-NOS)	38
5.9	Análisis por PCR de líneas transgénicas T2 para verificar la presencia del transgene	39
5.10	Patrón de expresión de líneas transgénicas mediante RT-PCR	40
5.11	Diferencia en altura en líneas: a) con el gene completo; b) con el gene deletado	41
5.12	Variación en el tamaño y coloración en a) gene completo; b) gene deletado	42
5.13	Deformación de inflorescencias ("raras") encontradas en algunas de las líneas transgénicas	43
5.14	Variación en el tamaño de a)roseta y b)no. de hojas en las diferentes Líneas transgénicas	43
5.15	Variación en el tamaño de a)inflorescencia y b)producción de semillas en las diferentes líneas transgénicas	44

5.16	Determinación de trehalosa mediante HPLC	46
5.17	Cuantificación de trehalosa en líneas con el gene completo, a) en contacto Con agua; b) en presencia de Validamicina A	46
5.18	Cuantificación de trehalosa en líneas con el gene deletado, a) en contacto Con agua; b) en presencia de Validamicina A	48
5.19	Análisis mediante HPLC de la inhibición de la trehalosa por medio de la enzima trehalasa.	48
5.20	Efecto del NaCl sobre plántulas de líneas transgénicas	49
5.21	Efecto del Sorbitol sobre plántulas de líneas transgénicas	50
5.22	Efecto del Frío sobre plántulas de líneas transgénicas	51
5.23	Efecto del choque térmico sobre plántulas de líneas transgénicas	52

RESUMEN

La productividad de las plantas se ve severamente afectada por condiciones de estrés abiótico, inducido por sequía, salinidad y baja temperatura. Las plantas responden a estas condiciones mediante adaptaciones bioquímicas y fisiológicas, de las cuales, alguna de estas son el resultado de cambios en la expresión génica. Las investigaciones con plantas transgénicas ofrecen un poderoso medio para obtener información acerca de los mecanismos que gobiernan la tolerancia a estrés. Específicamente, en algunos casos la incorporación de un gen ó varios podría brindar tolerancia al estrés por deshidratación en algunos cultivos.

La trehalosa es un compuesto que se acumula en *Saccharomyces cerevisiae*, algunas especies de bacterias, hongos, nemátodos, crustáceos, insectos y algunas plantas de resurrección y ha sido implicada en la tolerancia bajo varias condiciones de estrés, actuando como protector de membranas, como un osmolito o como una reserva de carbohidratos que puede ser movilizada durante estrés. Dos construcciones que llevan el gen *SITPS1* de *Selaginella lepidophylla*, el cual codifica para la enzima trehalosa 6-fosfato sintasa y el gen Δ *NSITPS1*, una delección del extremo amino-terminal de éste, fueron utilizadas en este trabajo para transformar plantas de *A. thaliana* por medio de infiltración al vacío mediada por *A. tumefaciens*. La construcción Δ *NSITPS1* se utilizó para evaluar si esta tiene que ver con un aumento de síntesis de trehalosa, así como para evaluar el efecto de la síntesis de este carbohidrato en condiciones de estrés osmótico, salino, frío y choque térmico.

Diversas líneas transgénicas homocigas fueron seleccionadas por su resistencia a kanamicina. La integración del transgene y su expresión fueron analizadas mediante técnicas de PCR y RT-PCR, respectivamente. El mayor contenido de trehalosa determinado en las líneas transgénicas homocigas, fué de 3.46 mg/g PS y de 0.47 mg/g PS para las líneas SI 7.4 y Δ NSI 7.1 respectivamente. Al estar en contacto con Validamicina A (un inhibidor de la enzima trehalasa), estos valores aumentaron, encontrándose en estas dos líneas el mayor contenido de trehalosa, 4.69 mg/g PS y 2.63 mg/g PS, respectivamente. Las cantidades de trehalosa obtenidas en el control (vector vacío) y WT, son alrededor de 10-15 veces menos que las líneas que más trehalosa produjeron. Algunas de las alteraciones morfológicas encontradas en las diferentes líneas transgénicas que sintetizan trehalosa, son retardo en el crecimiento, enanismo de las plantas y la presencia de deformación de las inflorescencias. Estas alteraciones sugieren un efecto negativo de la síntesis de trehalosa en la morfología y fisiología de la planta. Aunque hay reportes señalando la correlación de la síntesis de trehalosa en plantas y la resistencia hacia el estrés por sequía, no fué lo que se encontró en este trabajo, aunque hay síntesis de trehalosa, estas plantas no mostraron resistencia hacia el estrés osmótico, salino, frío y choque térmico. Los datos obtenidos en este trabajo sugieren que la síntesis de trehalosa en plantas más que dar un efecto osmoprotectante, altera el metabolismo de azúcares y sus rutas regulatorias afectando así el desarrollo de la planta y por consiguiente haciendo a la planta más sensible hacia el estrés.

CAPITULO I

INTRODUCCION

Uno de los principales problemas que enfrenta la agricultura hoy en día, es el estrés ambiental y se conoce que más de la mitad de las áreas de cultivo a nivel mundial y hasta 3/4 partes de nuestro país, se encuentran sometidas intermitentemente a sequía, salinidad, calor o frío. Estas condiciones ambientales limitan el crecimiento y productividad de las plantas, por lo que las investigaciones encaminadas a la obtención de variedades tolerantes al estrés ambiental son de gran importancia (Stewart, 1989).

Una planta modelo tolerante a la sequía, es la planta *Selaginella lepidophylla*, llamada planta de resurrección, por su capacidad de sobrevivir completamente deshidratada durante años y revivir unas horas después de humedecerse sin sufrir daño. *S. lepidophylla* es una planta inferior de la división Licophyta, originaria de México y del Suroeste de E.U., que produce el disacárido trehalosa en grandes cantidades (Adams *et al.*, 1990).

La trehalosa es un azúcar no reductor constituido de dos moléculas de glucosa que están unidas por sus carbonos reductores, esto hace a la trehalosa muy estable, y debido a esto es químicamente inerte y biológicamente no tóxica. Debido a su estabilidad, no toxicidad y nula reactividad química, la trehalosa puede ser un preservador ideal para moléculas biológicas, tales como proteínas, sabores, fragancias, o mezclas complejas como los alimentos mismos (Roser y Colaço, 1993).

La acumulación de trehalosa en *S. cerevisiae* está correlacionada con la adquisición de tolerancia a temperaturas elevadas, congelamiento y desecación (Hottiger, 1987). De esta forma, la trehalosa parece actuar no solamente como reserva de carbohidratos sino también protegiendo contra el estrés (Wiemken, 1990). En la naturaleza, la trehalosa, sirve como protector contra el estrés abiótico ya que se ha encontrado en organismos capaces de sobrevivir la deshidratación y temperaturas extremas tales como algunas especies de bacterias, levaduras, crustáceos, insectos, nemátodos y ciertas plantas de resurrección (Weisburd, 1988; Crowe *et al.*, 1992; Müller *et al.*, 1995; Müller *et al.*, 1999). La síntesis y acumulación de trehalosa en plantas, depende de las enzimas trehalosa 6-fosfato sintasa (Tps) y trehalosa 6-fosfato fosfatasa (Tpp). Hace algunos años en el laboratorio del Dr.

Iturriaga se reportó la primer secuencia codificante del cDNA (*SITPS 1*) responsable de la síntesis de trehalosa en *S. lepidophylla* (Zentella e Iturriaga, 1996), y posteriormente, fué reportado el aislamiento y caracterización molecular del gen *SITPS1*, el cual corrigió la inhabilidad para crecer en glucosa de la mutante *Tps1Δ*, además de corregir la sensibilidad de la mutante al estrés osmótico y térmico (Zentella *et al.*, 1999). Cabe mencionar que este fué el primer gen o cDNA en su tipo que se aisló de una planta o animal. La síntesis de trehalosa en plantas transgénicas podría ser utilizada para manipular genéticamente cultivos de interés agrícola y brindarles de esta forma tolerancia a diferentes tipos de estrés ambiental. Además, las plantas o partes de ellas que sinteticen trehalosa, podrían ser preservadas en estado completamente deshidratado por largos periodos sin la necesidad de refrigeración y conservando sus propiedades organolépticas.

La enzima trehalasa que degrada la trehalosa a dos moléculas de glucosa, se encuentra en el tracto digestivo de mamíferos y humanos. Y dado que, una gama de alimentos que se consumen cotidianamente, tales como la miel de abeja, hongos, pan, cerveza, vino, vinagre, etc., contienen trehalosa (Roser y Colaco, 1993), el consumo de este disacárido en otros alimentos no representa un riesgo para la salud (Gudmand-Hoyer, 1994).

La trehalosa es un aditivo que tiene la propiedad única de preservar a los alimentos en estado deshidratado y conservar sus propiedades de sabor, olor y consistencia al ser rehidratados. Por otro lado, la trehalosa también conserva la bioactividad de enzimas, vacunas, liposomas, etc., almacenados a temperatura ambiente en estado deshidratado. El uso potencial de la trehalosa abarca también a las industrias farmacéuticas y agroalimentarias. La síntesis de altos niveles de trehalosa en plantas u otros organismos transformados, representa potencialmente una fuente barata de trehalosa para la industria si se compara con el precio actual de la obtención de trehalosa de levadura (Kidd y Devorak, 1994).

Por ejemplo se ha reportado la síntesis de trehalosa en tabaco transgénico utilizando los genes *otsA* y *otsB* de *E. coli*, con funciones sintasa y fosfatasa respectivamente, bajo el control del promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S. Sin embargo, los niveles de trehalosa fueron de 0.011% de peso fresco, lo cual resulta ser insuficiente para fines de escalamiento e industrialización (Goddijn *et al.*, 1997). Por otra parte se ha reportado también la obtención de plantas transgénicas de tabaco tolerantes a sequía utilizando el gen responsable de la síntesis de trehalosa (*Tps1*) en levadura (Hölmstrom *et al.*, 1996). En dichas plantas la síntesis de trehalosa constituye de 0.08 a 0.32 % de peso seco, lo que

significa una acumulación baja de trehalosa, si se tiene como objetivo escalar la producción de este disacárido en plantas transgénicas.

En el presente trabajo se transformaron plantas de *A. thaliana*, con el gen *SITPS1* de *S. lepidophylla* y una versión deletada (Δ *NSITPS1*) del mismo, con la finalidad de observar si se podrían aumentar los niveles de trehalosa. En investigaciones anteriores se ha demostrado que al ser deletado el extremo amino-terminal de los genes *SITPS1* y *AtTPS1* y al ser introducidos en levadura se eleva significativamente la síntesis de trehalosa (Iturriaga, *et al.*, 1998). Otro objetivo del trabajo fue evaluar la tolerancia de las plantas transgénicas que sobreexpresaban los genes *SITPS1* y Δ *NSITPS1* al estrés osmótico, salino, frío y calor.

Capítulo II

Antecedentes

2.1 Estrés en Plantas

En la naturaleza, las plantas experimentan condiciones adversas tanto bióticas como abióticas bajo las cuales las especies vegetales no alcanzan a desarrollarse totalmente o sufren daños irreversibles, enfermedades y mueren antes de completar su ciclo vital. En la agricultura, el desarrollo de los cultivos está limitado en aproximadamente el 25 % de su potencial, debido al estrés ambiental. El estrés ocurre cuando hay un cambio en las condiciones ambientales y éstas últimas dejan de ser óptimas. Este cambio da lugar a un cambio fisiológico, el cual puede resultar en la reducción del crecimiento y producción, aclimatación fisiológica, adaptación y diferenciación, o una combinación de estos (Nielsen y Orcutt, 1996).

Un agente que da lugar a una situación de estrés es una característica del ambiente (o combinación de características que causan una alteración en la fisiología de las plantas. Existe una diversidad de estos agentes que pueden afectar los procesos fisiológicos de la planta, en general, los factores que dan lugar a una situación de estrés se pueden clasificar en dos grupos (tabla 2.1). Los atributos físicos del ambiente pueden afectar los patrones fisiológicos en una manera positiva o negativa, por ejemplo, la temperatura incrementa la función de enzimas en un cierto rango, por encima de esta resulta en inhibición de su actividad. Algunos atributos químicos del ambiente pueden dar lugar a una situación de estrés, si están normalmente en el ambiente (contaminación, pesticidas), o en alta concentración (salinidad, pH). Los factores abióticos, tales como congelamiento, sequía, salinidad e inundación influyen sobre el desarrollo, crecimiento y productividad de las plantas (Figura 2.1). Con excepción de la inundación, todos los demás tipos de estrés abióticos resultan en déficit hídrico (Holmberg y Bülow, 1998). Los factores bióticos son aquellos relacionados con la interacción entre poblaciones de algunos animales, hongos, bacterias, virus y plantas, estos son patógenos que causan pérdida significativa a la agricultura (Nielsen y Orcutt, 1996). La influencia de un agente particular sobre los procesos fisiológicos de una especie vegetal en particular no es siempre igual. Una planta puede ser diferencialmente sensible a un tipo de estrés particular a lo largo de su ciclo de

vida, por ejemplo, si un estrés hídrico ocurre en la etapa adulta de un cultivo, su efecto puede tener poco o ningún impacto sobre la productividad, de lo contrario, si el mismo estrés hídrico se da en la etapa juvenil del cultivo, se puede reducir la producción severamente.

ABIOTICOS		BIOTICOS
FISICOS	QUIMICOS	Bacterias
Sequía	Contaminación del aire	Herbívoros
Temperatura	Metales pesados	Insectos
Inundación	Toxinas	Hongos patógenos
Radiación	Pesticidas	Virus
Viento	Salinidad y pH del suelo	Competencia

Tabla 2.1 Lista de factores que producen algún tipo de estrés en plantas (Modificado de Nielsen y Orcutt, 1996).



Figura 2.1. Diferentes factores de estrés ambiental, resultando en estrés abiótico. (Holmberg y Bülow, 1998)

Entre los factores abióticos, el insignificante suministro de agua es el principal factor que limita el crecimiento y sobrevivencia de las plantas superiores sobre la tierra. La célula vegetal para compensar estas limitaciones tiene que regular la entrada y salida de agua e iones, manteniendo la homeostasis celular la cual está regulada por la membrana plasmática. Las membranas celulares sirven como una barrera impermeable a macromoléculas y a la mayoría de compuestos de bajo peso molecular, además de servir como un importante sensor de los cambios ambientales en las plantas. La estructura de las membranas es muy similar entre los diferentes organelos citoplásmicos, consistiendo de una fase lipídica, proteínas, esteroides y carbohidratos embebidos en esta. Sin embargo, lo que las diferencia es que estos cuatro componentes principales varían altamente cuantitativa y cualitativamente entre organelos, tejidos vegetales, especies y cultivares. Estos componentes membranales cambian con el ambiente tratando de mantener la homeostasis celular, lo cual le permite a la célula, tejido o planta sobrevivir y funcionar bajo las nuevas condiciones (Nielsen y Orcutt, 1996). Cuando las concentraciones de solutos extracelulares son aumentadas o se forma hielo extracelular, hay un flujo de agua desde las células hacia afuera, causando una disminución en el turgor y un incremento en concentraciones de solutos intracelulares (Lichtentaler, 1995) sometiendo, de esta forma una tensión sobre membranas y macromoléculas. Una disminución en la disponibilidad de agua causa el cierre de estomas y una drástica disminución de la fotosíntesis, que se restaura al disponer de agua la planta; sin embargo, una sequía severa da lugar a una completa inhibición de la fotosíntesis, debido a daños en las membranas de los tilacoides y a que los cloroplastos se sobrecargan de electrones reductores (Smirnov, 1993), dando lugar a una fotoreducción del oxígeno y una producción concomitante de intermediarios reactivos de oxígeno tales como peróxidos y superóxidos, los cuales dañan las membranas y enzimas (Allen, 1995).

La percepción del déficit hídrico celular necesita ser traducido en adaptaciones metabólicas, fisiológicas y bioquímicas a la condición de estrés impuesta (Ingram y Bartels, 1996). Al menos cuatro rutas de transducción de señales han sido reportadas que están involucradas en la respuesta de las plantas hacia el estrés osmótico: dos son dependientes de ácido abscísico (ABA I y II) y dos son independientes de ABA (III y IV) (Shinozaki y Yamaguchi-Shinozaki, 1996). Estas rutas dan lugar a la activación o síntesis de factores de transcripción tales como MYB/MYC (Abe *et al.*, 1997) y bZIP (Hollung *et al.*, 1997; Nakagawa *et al.*, 1996), que se activan bajo diferentes condiciones de estrés.

Una de las estrategias que más se han usado recientemente para entender la función de los genes relacionados a la tolerancia a la desecación, es la utilización de plantas

transgénicas (Goddijn y Pen, 1995; García, 1997; Goddijn, 1997, Romero, 1997). Algunos de estos estudios (Goddijn, 1997, Romero, 1997) expresan constitutivamente ciertos genes de tolerancia a estrés y esto puede afectar el desarrollo normal de las plantas, por lo que es deseable generar plantas transgénicas que sintetizen altos niveles de osmoprotectores o proteínas sólo bajo condiciones de estrés.

2.1.1 Estrategias de Resistencia al Estrés Hídrico

Se ha propuesto (Levitt, 1972), que las plantas pueden ya sea **Escapar** o **Resistir** la sequía, **Evitando** una reducción de su estatus hídrico o **Tolerando** tal reducción. Las plantas han desarrollado un gran número de estrategias que les permiten sobrevivir del estrés hídrico. Las plantas pueden escapar a la sequía germinando en la temporada de lluvias, creciendo rápidamente, floreciendo y produciendo semilla antes de que el suministro de agua se haya terminado, esta estrategia es utilizada por plantas semidesérticas, y es la base de las variedades de temporada corta. Si las plantas no pueden escapar, pueden resistir evitando o tolerando la deshidratación, la cual se puede evitar reduciendo la actividad metabólica, aumentando la toma de agua, reduciendo la pérdida de agua o ambos. Por otro lado, las raíces profundas aumentan la toma de agua y tanto el cierre de estomas como el movimiento de las hojas reducen la pérdida de ésta. A pesar de que la mayoría de las plantas agrónomicamente importantes son muy sensibles al déficit de agua, la mayoría de las plantas en alguna etapa de su ciclo de vida son tolerantes a la deshidratación, tales como las semillas, las esporas o el polen.

Las plantas toleran la deshidratación debido a mecanismos que mantienen elevada su actividad metabólica (similar a la que tienen en ausencia de estrés) bajo estrés medio y reducida actividad metabólica bajo estrés severo (Osmond, 1987), las plantas con estas características se les llaman plantas de resurrección (Gaff, 1989). *Craterostigma plantagineum*, *Selaginella lepidophylla*, y *Myrothamnus flabellifolia*, son solo algunos ejemplos de este tipo de plantas, las cuales se han utilizado como modelo para estudiar los mecanismos involucrados en la tolerancia a la sequía. Una ventaja particular de estas plantas en estudios a nivel molecular, es que la tolerancia a la desecación puede ser investigada tanto en plantas enteras, hojas aisladas y en cultivos de callos no diferenciados (Bartels *et al.*, 1990). Además específicamente en la planta de resurrección *C. plantagineum*, los genes inducidos por desecación tienen un alto porcentaje de identidad con genes presentes en semillas de otras especies vegetales no tolerantes (Ingram y Bartels, 1996).

2.1.2 Adaptación de las Plantas al Déficit Hídrico

Las plantas utilizan diferentes tipos de estrategias adaptativas para aliviar los efectos detrimentales del estrés por deshidratación. Las adaptaciones en el desarrollo, estructurales ó fisiológicas de las plantas para contender con el estrés, están frecuentemente basadas en mecanismos complejos que involucran la inducción de genes aún no caracterizados (McCue y Hanson, 1990). Algunos de los genes inducidos por déficit hídrico, codifican para polipéptidos con funciones protectoras en las células sometidas a estrés, tales como el secuestro de iones, la estabilización de membranas y función de chaperonas (Bray, 1993). Tales proteínas protectoras, incluyendo las dehidrinas (proteínas LEA), se acumulan en plantas durante la maduración de las semillas así como en tejidos vegetativos en respuesta a sequía, salinidad y baja temperatura (Baker *et al.*, 1988). Otro tipo de sustancias protectoras que se acumulan durante la baja disponibilidad de agua son las pequeñas moléculas orgánicas llamadas solutos compatibles, osmolitos u osmoprotectores (Yancey *et al.*, 1982). Estas moléculas se pueden acumular a altos niveles en respuesta a estrés sin perturbar los procesos metabólicos o estructuras y funciones celulares. Se han encontrado en la mayoría de los organismos vivos, desde las bacterias hasta el hombre, aunque no todos estos organismos utilizan los mismos osmoprotectores. De hecho, sólo un número limitado de compuestos orgánicos son empleados comúnmente como tales: 1) compuestos cuaternarios de amonio tales como glicina betaína, 2) algunos aminoácidos como prolina, 3) polioles como inositol y manitol y 4) azúcares incluyendo sacarosa y trehalosa (Yancey *et al.*, 1982; Mac Cue y Hanson, 1990; Bohnert *et al.*, 1995) (Figura 2.2).

La protección por osmolitos se lleva a cabo por dos mecanismos separados pero coincidentes, el ajuste osmótico y la osmoprotección. Durante el ajuste osmótico u osmoregulación, la acumulación de osmolitos ayuda a las células a mantener el balance de agua para mantener el turgor celular. La osmoprotección se debe a que éstas moléculas estabilizan a las macromoléculas y por lo tanto mantienen la integridad de las membranas en las células afectadas por el estrés causado por la pérdida de agua (Yancey *et al.*, 1982; Crowe *et al.*, 1992). Este papel protector de los osmolitos ha sido claramente establecido por estudios *in vivo* correlacionando la acumulación de osmolitos con la tolerancia a estrés (Wiemken, 1990; Deiauney y Verna, 1993; Strom y Kaasen, 1993) y por estudios *in vitro* demostrando la protección de enzimas por los osmoprotectores contra su inactivación por estrés (Colaço *et al.*, 1992). La biosíntesis de osmolitos ha sido bien caracterizada en algunos casos y se ha demostrado que involucra un número limitado de pasos. Los genes requeridos para la biosíntesis de varios osmolitos han sido clonados tanto de organismos

procariotes como de eucariotes (Mac Cue y Hanson, 1990; Delauney y Verna, 1993). Consecuentemente, la ingeniería genética de biosíntesis de osmolitos está llegando a ser factible y hay realmente ejemplos de aplicación adecuada, como es el caso de la sobreproducción de manitol y prolina en tabaco transgénico (Tarczynski *et al.*, 1993; Kishor *et al.*, 1995) dando como resultado una tolerancia a la salinidad y al déficit hídrico, respectivamente. Sin embargo, esto no ha funcionado adecuadamente, pues estos resultados no se han podido reproducir en el campo.

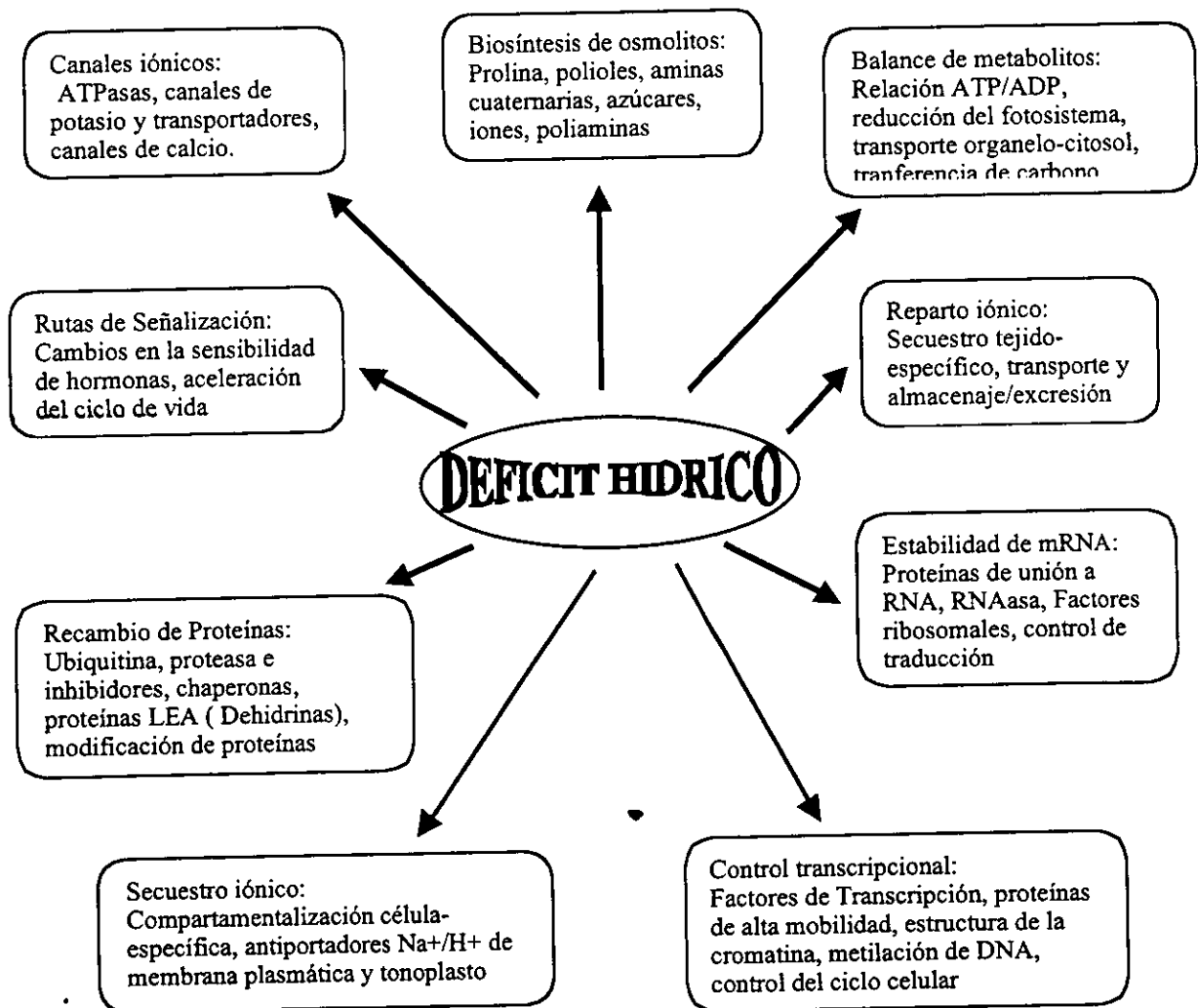


Figura 2.2. Respuestas de las plantas al déficit hídrico. (Bohnert *et al.*, 1995)

Como dije anteriormente, una de las sustancias que funcionan como osmoprotectoras, son los azúcares, entre los cuales se encuentra la trehalosa. Este disacárido es el azúcar

osmoprotector más efectivo en términos de concentración mínima requerida (Crowe *et al.*, 1992). Mientras que la trehalosa es extremadamente rara en plantas, la sacarosa junto con otros azúcares, parece sustituirla. A pesar de que la acumulación de azúcares, no es la única forma en la cual las plantas combaten la deshidratación (Bonhert *et al.*, 1995), es considerado como un factor importante en la tolerancia. Los azúcares son importantes no sólo por su función como osmoprotectores, sino porque son parte del metabolismo de carbono en las plantas. El balance de carbono es el integrador maestro de múltiples limitaciones en plantas. Cuando un estrés tiene una influencia detrimental en el crecimiento de las plantas, esto es reflejado en cambios en el balance de carbono (figura 2.3).

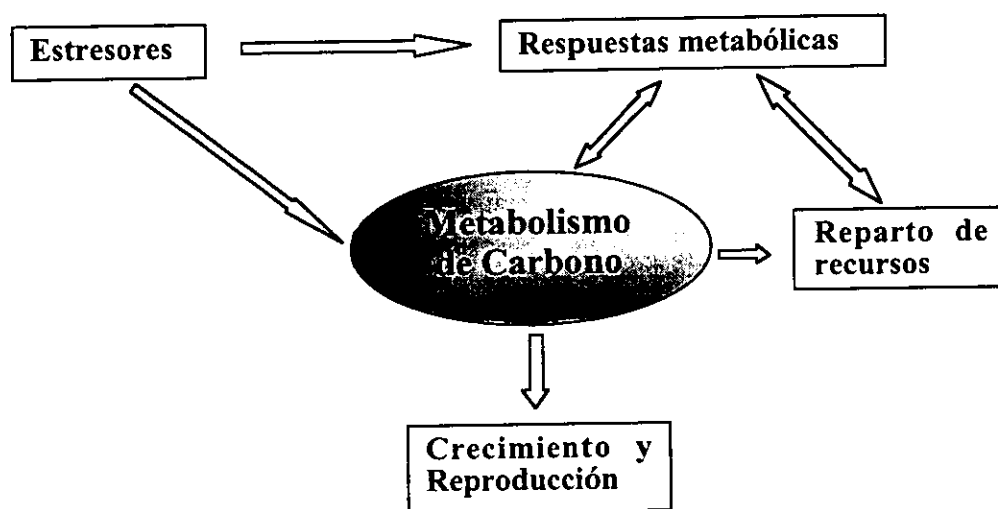


Figura 2.3 El metabolismo de carbono como integrador maestro de la influencia de diferentes tipos de estrés sobre la fisiología de la planta (Nielsen y Orcutt, 1996).

2.2 Trehalosa

La trehalosa (figura 2.4), es un disacárido no reductor formado por dos unidades de glucosa (α -D-glucopiranosil-(1,1)- α -D-glucopiranosido) que se encuentra presente en una variedad de microorganismos y animales invertebrados (Crowe *et al.*, 1984). Ciertas plantas y animales de hábitats desérticos tienen la notable propiedad de ser capaces de permanecer completamente secos sin presentar daño al ser rehidratados. Las plantas de resurrección *Selaginella lepidophylla*, *Craterostigma plantagineum*, organismos como *Artemia salina*,

Ditylenchus dipsaci y *Saccharomyces cerevisiae* tiene la característica particular de contener grandes cantidades de trehalosa (Roser, 1991). La síntesis y acumulación de trehalosa se han investigado principalmente en levaduras y hongos; y se ha encontrado que en la levadura *S. cerevisiae* se acumulan elevadas cantidades de trehalosa en la fase estacionaria de crecimiento y además se encuentra presente en el citoplasma celular (Keller *et al.*, 1982).

La acumulación de trehalosa en *S. cerevisiae* está correlacionada con la adquisición de la tolerancia a altas temperaturas (50°C), las cuales normalmente son letales (Hottiger *et al.*, 1987), y a la desecación. Esta acumulación puede ser inducida por condiciones de estrés, como en el caso de la bacteria *E. coli* cuando es expuesta a condiciones de estrés osmótico acumula trehalosa (Hottiger *et al.*, 1987; Gadd *et al.*, 1987). Por lo anterior se piensa que la trehalosa no sólo es una forma de reserva de carbohidratos, sino que también actúa como un protector contra daño, particularmente en condiciones de desecación y en condiciones de estrés por calor en bacterias y levaduras (Wiemken, 1990).

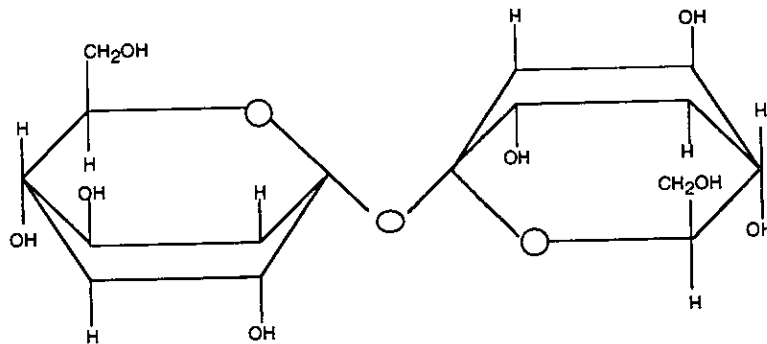


Figura 2.4. Estructura de la trehalosa

En insectos la trehalosa es el azúcar principal en los músculos del torax y es consumido durante su vuelo (Kono *et al.*, 1994). En vertebrados y plantas superiores, la trehalosa no está usualmente presente (Müller *et al.*, 1995), sin embargo la mayoría de las plantas contienen la actividad de trehalasa, enzima que rompe el disacárido trehalosa evitando su acumulación. Recientemente genes con homología funcional a aquellos que participan en la síntesis de trehalosa en levadura se han identificado en *A. thaliana* (Voguel, 1998; Blazquez *et al.*, 1998) y *S. lepidophylla* (Zentella, *et al.*, 1999), por lo que se pudiera pensar

en la síntesis de trehalosa en plantas. En las plantas, la sacarosa parece cumplir funciones similares a la trehalosa en cuanto a protección y almacenaje; sin embargo, éste azúcar es la principal forma de transporte de carbohidratos y juega un papel central en el reparto de fotosintatos desde organos "fuente" a organos "depósito" (Roitsch, 1999).

Además, se ha demostrado *in vitro* que, la trehalosa puede proteger membranas contra daños por estrés osmótico y bajo condiciones de altas temperaturas. Se ha propuesto que este azúcar protege, ya que permite que los lípidos permanezcan en estado fluido, evitando así la separación de fases, la fusión y que las membranas se rompan (Crowe *et al.*, 1984). También se sabe que la trehalosa, es mejor protector que el glicerol, y que aumenta la estabilidad termal de enzimas citoplásmicas *in vitro* y que bajo estas mismas condiciones es un efectivo protector de células vegetales reduciendo a la vez daño por congelamiento durante la criopreservación (Bhandal *et al.*, 1985). Esta capacidad de preservación de la actividad enzimática y el hecho de que evita la desnaturalización de proteínas cuando son sometidas a desecación y luego a rehidratación han llevado a la idea de utilizar a la trehalosa como preservador de productos biológicos como vacunas, enzimas, sangre, etc (Colaço *et al.*, 1992; Weisburd, 1988).

Los mecanismos por los cuales la trehalosa estabiliza macromoléculas son aún inciertos; existen dos hipótesis que tratan de explicar estos mecanismos: Una hipótesis es que la trehalosa preserva macromoléculas debido a que sus grupos hidroxilos pueden formar puentes de hidrógeno, los cuales toman el lugar de las moléculas de agua que normalmente se unen a la superficie de las macromoléculas, contribuyendo a mantener y estabilizar la estructura terciaria de las proteínas, está es la "hipótesis del remplazamiento de agua" (Clegg, 1985; Crowe *et al.*, 1998). Otra hipótesis es la llamada "vitrificación", que propone que la trehalosa en solución, tiende a vitrificar, formando una capa cristalina amorfa líquida, pero con propiedades mecánicas de un sólido, que evita el movimiento molecular por lo que las reacciones degradativas de las proteínas debido a esto son insignificantes (Crowe *et al.*, 1998; Koster, 1991).

2.2.1 Metabolismo de Trehalosa en Microorganismos y Animales

En *S. cerevisiae*, *E. coli* e insectos la trehalosa es sintetizada por dos pasos enzimáticos (figura 2.5), catalizados por la trehalosa 6-fosfato sintasa (TPS) que sintetiza trehalosa 6-fosfato a partir de glucosa 6-fosfato y UDP-glucosa y por la trehalosa 6-fosfato fosfatasa (TPP) que remueve el fosfato para producir trehalosa (Cabib y Leloir, 1958).

En *S. cerevisiae* estas dos enzimas se encuentran presentes en un complejo citosólico, denominado complejo TPS, en el cual actúan cuatro proteínas Tps1, Tps2, Tps3 y Tsl1. La Tps1 tiene actividad sintasa, la Tps2 actividad fosfatasa, mientras que Tps3 y Tsl1 actúan como reguladores de la actividad del complejo (Thevelein y Hohmann, 1995).

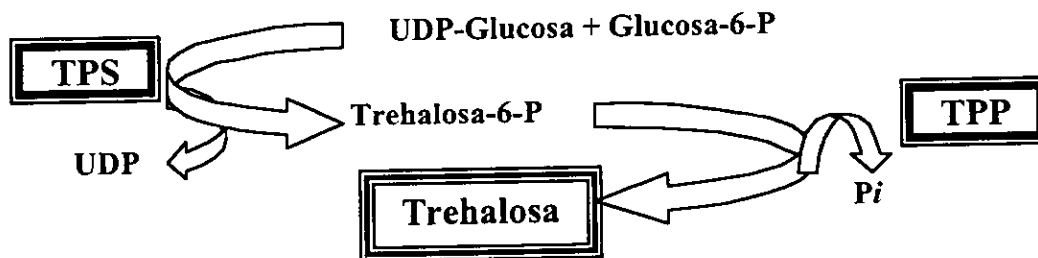


Figura 2.5. Biosíntesis de trehalosa en levaduras

Recientemente, ha sido identificada una ruta alternativa para la biosíntesis de trehalosa en algunas bacterias. En este caso, se degrada glucógeno o almidón, y los residuos de glucosa son transferidos primero a residuos de glucosa terminal y luego a maltooligómeros creando un enlace α -1-1- α , estos residuos de trehalosa terminal son entonces liberados por la enzima maltooligosil trehalosa sintasa (Nakada, 1995, fig. 2.6) y dando lugar al disacárido trehalosa.

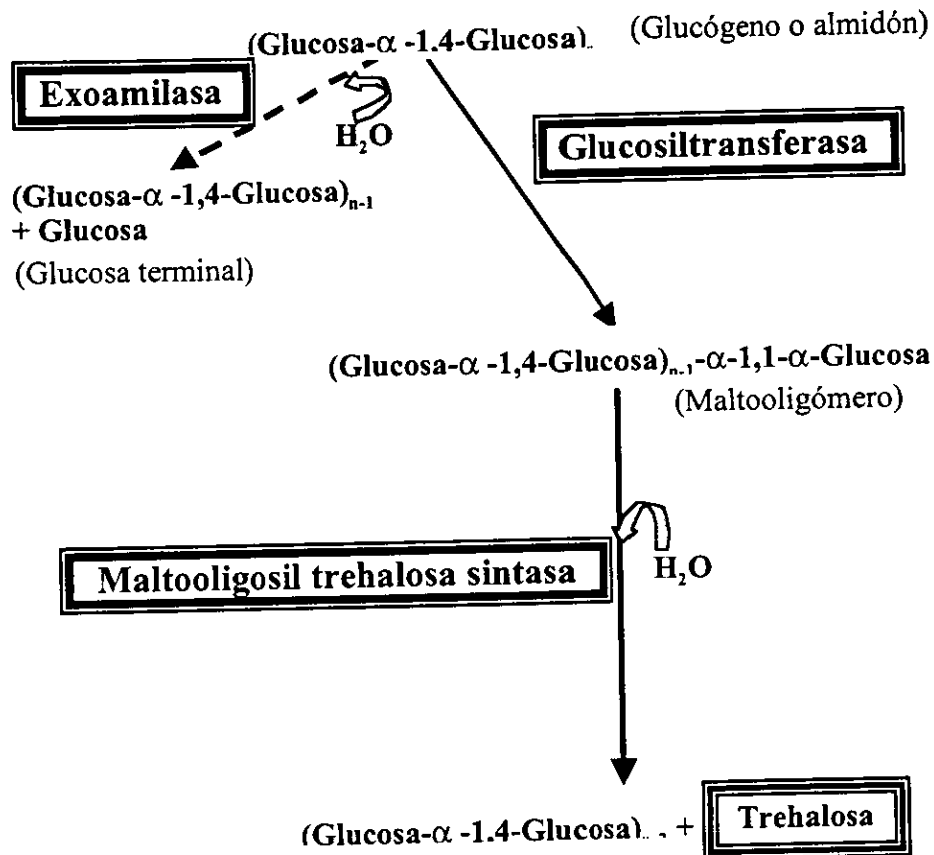


Figura 2.6. Biosíntesis de trehalosa en algunas bacterias (Müller, *et al.*, 1999)

Por otro lado, la trehalosa es específicamente hidrolizada por la acción de la trehalasa (figura 2.7 a), la cual produce dos unidades de glucosa, esta enzima se encuentra presente en algunos organismos incluyendo plantas. De forma alternativa, la degradación y biosíntesis de trehalosa puede ser realizada por la trehalosa fosforilasa (fig. 2.7 b), una enzima reversible aislada de *Euglena* (Maréchal y Belcopitow, 1971) y de otros organismos (Aisaka y Masuda, 1995).

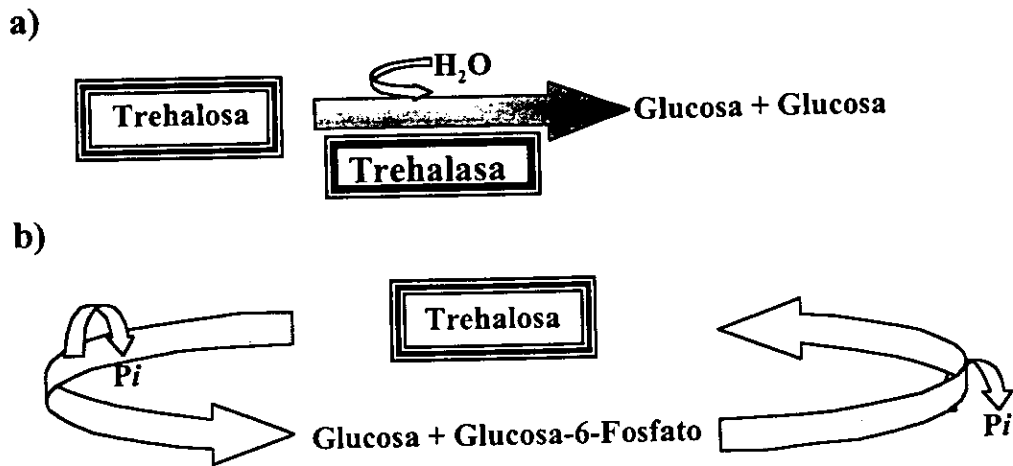


Figura 2.7 Mecanismo de acción de: a.- Trehalasa b.- Trehalosa Fosforilasa

2.2.2 Metabolismo de trehalosa en plantas

La trehalosa fué inicialmente aislada de la planta de resurrección *S. lepidophylla* (Anselmino y Gilg, 1913); esta planta llega a permanecer metabólicamente inactiva durante periodos secos y revive cuando el agua está otra vez disponible (Figura 2.8). Durante sequía extrema los niveles de trehalosa aumentan hasta un 20 % en hojas, posiblemente protegiendo estructuras celulares. La trehalosa fué también detectada en *Myrothamnus flabellifolius* y en *Sporobolus stapfianus* encontrando un ligero incremento en los niveles de trehalosa asociado con la deshidratación (Drennan *et al.*, 1993).

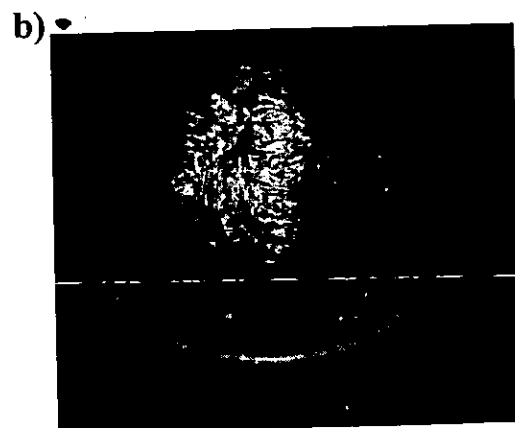
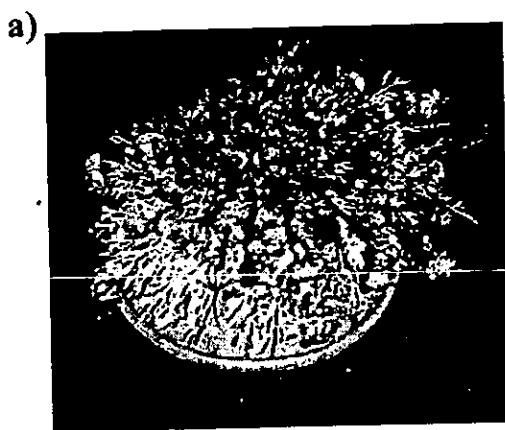


Figura 2.8 Resurrección de *Selaginella lepidophylla*, a) hidratada, b) Deshidratada

En base a que los dos precursores de la síntesis de trehalosa (UDP-glucosa y glucosa 6-fosfato) son comunes en plantas y a la evidencia de que los genes necesarios para producir y degradar trehalosa de, dos precursores comunes en plantas son expresados en plantas superiores, no es descartable que este disacárido esté presente en éstas últimas. Se han identificado actividades de TPS y TPP en polen de *Lillium* pero no han sido caracterizados con detalle, especialmente con respecto a la producción de trehalosa (Gussin y McCormack, 1970).

En los últimos años se ha incrementado el interés en la aplicación del metabolismo de la trehalosa para manipular genéticamente cultivos tolerantes a sequía. Por ejemplo, la biosíntesis de trehalosa fué manipulada genéticamente en tabaco (Goddijn *et al.*, 1997, Romero, 1997) y papa (Goddijn *et al.*, 1997).

En *Arabidopsis*, una TPS (*AtTPS1*) ha sido identificada por complementación de una mutante de levadura carente de la misma; esta levadura transgénica restablece el crecimiento en glucosa (Blazquez *et al.*, 1998). Por otra parte, un cDNA de la TPS de *S. lepidophylla* (*SITPS1*), se expresó en una mutante *tps1* de levadura y se observó que, además de restablecer el crecimiento de la mutante en glucosa fué capaz de provocar resistencia a choques térmicos e inducir termotolerancia, así como de resistir estrés osmótico con sorbitol y salino (Zentella *et al.*, 1999).

Sin embargo, también la expresión aparentemente constitutiva de la trehalasa puede prevenir la acumulación de trehalosa, esto puede explicar porque plantas suministradas con trehalosa externa (Müller *et al.*, 1995) y plantas transgénicas sobreexpresando genes bacterianos de TPS (Goddijn *et al.*, 1997), acumulan trehalosa solo cuando la trehalasa es inhibida por la aplicación de validamicina A. En estos estudios han sido identificadas cantidades muy pequeñas de trehalosa aún en plantas de papa no transformadas cultivadas en presencia de validamicina A (Goddijn *et al.*, 1997).

2.2.3 Papel de la trehalosa en simbiosis

Independientemente del metabolismo endógeno de trehalosa, las plantas superiores llegan a estar en contacto con la trehalosa durante interacciones con microorganismos

(Müller *et al.*, 1995). La trehalosa se ha encontrado presente en raíces durante interacciones con hongos antagonistas (Keen y Williams, 1969), hongos endomicorrizas (Schubert *et al.*, 1992; Shachar-Hill *et al.*, 1995; Schellenbaum *et al.*, 1998), hongos ectomicorrizas (Ineichen y Wiemken, 1992) y bacterias fijadoras de nitrógeno (Phillips *et al.*, 1984; Müller *et al.*, 1994).

En estas relaciones simbióticas, la cantidad de trehalosa parece ser influenciada tanto por el genotipo del simbionte como por el genotipo de la planta (Müller *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1996). En plantas de soya mutantes dañados en la regulación de la formación de nódulos y en nódulos establecidos en presencia de nitrato, la cantidad de trehalosa es menor que en nódulos silvestres (Müller *et al.*, 1995). En ambos casos esta disminución está acompañada del aumento de la sacarosa. Una situación diferente se observa durante el estrés por sequía en la que dependiendo de la especie del simbionte los niveles de la sacarosa y de la trehalosa aumentan indicando un posible papel de la trehalosa como soluto compatible (Müller *et al.*, 1996).

2.2.4 Toxicidad de la trehalosa y alteraciones en el desarrollo

Las investigaciones enfocadas a incrementar la resistencia a sequía en plantas, transformándolas con genes bacterianos o de levaduras que codifican para enzimas sintetizadoras de trehalosa, tienen el objeto de explotar el potencial de la trehalosa como protector de estrés. En algunos casos se consigue aumentar la resistencia a estrés salino como es el caso del arroz (García *et al.*, 1997)

Sin embargo, las plantas transgénicas que incrementan los niveles de trehalosa muestran alteraciones en el crecimiento. El estado fisiológico de estas plantas es incierto y no se sabe hasta el momento si la concentración de trehalosa o de trehalosa 6-fosfato, o el consumo de glucosa 6-fosfato a expensas de la síntesis de trehalosa sean tóxicas para la planta; o su toxicidad se presenta porque al sintetizar trehalosa se interfiere con la regulación de carbono en la planta. De cualquier forma, un entendimiento del metabolismo endógeno de trehalosa en plantas y de su posible papel en la regulación de procesos fisiológicos son necesarios para poder explotar sus propiedades protectoras y lograr un desarrollo adecuado de las plantas transgénicas.

Uno de los primeros estudios acerca de la toxicidad que las plantas presentan ante la aplicación exógena de trehalosa fueron realizados en *Cuscuta sp* y *Lemna sp*, dos plantas

con una muy baja actividad de trehalosa (Veluthambi *et al.*, 1981). Otra planta que es muy sensible a trehalosa aplicada externamente es *Arabidopsis*. Recientemente se reportó que si la trehalosa es alimentada exógenamente a plántulas de *Arabidopsis* activas fotosintéticamente, se induce la expresión de la ADP-glucosa pirofosforilasa y la acumulación de almidón en las plántulas, y se reduce el crecimiento de la raíz. Estos resultados sugieren que la trehalosa interfiere con la repartición de carbono en los órganos de almacenaje y de esta manera altera el crecimiento de la planta (Wingler *et al.*, 2000).

La trehalosa puede también afectar la expresión de genes regulados por carbohidratos por medio de dos mecanismos hipotéticos: actuando como un análogo de sacarosa o suministrando glucosas que se liberan por la degradación de trehalosa. De esta manera, la trehalosa puede jugar un papel en la fina "sintonía" metabólica y en el desarrollo de la planta (García *et al.*, 1997).

2.3 Modelo de Estudio: *Arabidopsis thaliana*

2.3.1 La Planta

Arabidopsis thaliana (Figura 2.9) es un miembro de la familia de las Crucíferas ó Brassicaceas con una amplia distribución a través de Europa, Asia y Norte América (Meyerowitz, 1987). Algunos ecotipos diferentes han sido recolectados de poblaciones naturales. Los ecotipos más aceptados para llevar a cabo estudios genéticos y moleculares son Columbia y Landsberg. El ciclo de vida completo desde que la semilla germina hasta la maduración de las primeras semillas se lleva a cabo en 6 semanas. *Arabidopsis* es una planta pequeña; las flores miden 2 mm, autopolinizan cuando el brote floral se abre y puede ser entrecruzada aplicando exógenamente polen a la superficie del estigma.

Las semillas miden 0.5 mm al madurar, cada una pesando un promedio de menos de 20 µg y son producidas en frutos delgados conocidos como silicuas. Las plántulas se desarrollan en rosetas que varían de diámetro de 2 a 10 cm dependiendo de las condiciones de crecimiento. Las hojas están cubiertas con pequeños pelos unicelulares conocidos como tricomas que se han utilizado como modelos convenientes para estudiar la morfogénesis y diferenciación celular.

Las plantas pueden ser crecidas en cajas de petri o mantenidas en macetas pequeñas (5 x 5 cm) localizadas en un invernadero o bajo luces fluorescentes en el laboratorio. Los brotes inician 3 semanas después de ser sembradas y la inflorescencia resultante forma una progresión lineal de flores y silicuas por varias semanas antes de la senescencia.

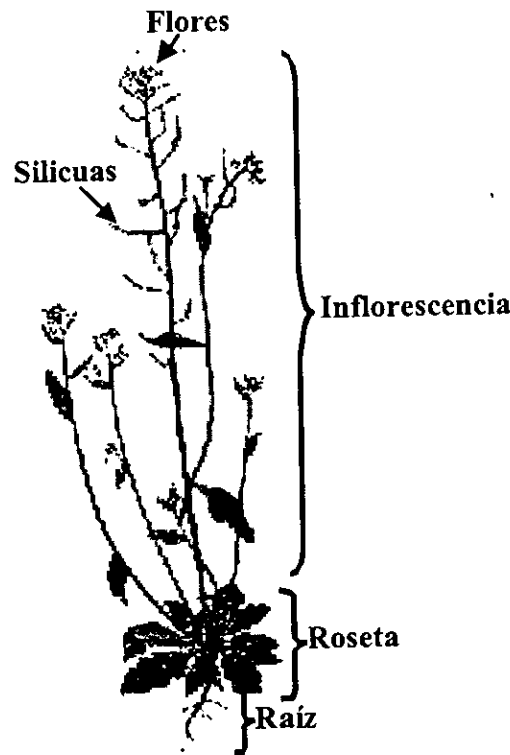


Figura 2.9. Planta de *Arabidopsis thaliana* (Tomado de The *Arabidopsis* Information Resource, TAIR, 2000)

Las flores están compuestas de una espiral exterior de cuatro sépalos verdes y una espiral interior conteniendo cuatro pétalos blancos, seis estambres conteniendo polen y un gineceo central que forma la silicua. Las plantas maduras alcanzan de 30-40 cm en altura (Meyerowitz, 1987) y frecuentemente producen cientos de silicuas con más de 5000 semillas totales. Las raíces son simples en estructura, fáciles de estudiar en cultivo y no establecen relaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno. Esta planta tiene patógenos naturales que incluyen una variedad de insectos, bacterias, hongos y virus (Meinke *et al.*, 1998).

2.3.2 Organización y tamaño del genoma

El genoma de *Arabidopsis* es inusual por dos razones fundamentales, por un lado tiene un genoma de tamaño pequeño (120-130 Mb) comparado con el tabaco que tiene un genoma de 1, 600 Mb; el chícharo de 4, 500 Mb y el trigo de 5, 900 Mb (Meyerowitz, 1985) y por otro lado, prácticamente no tiene DNA repetido entremezclado. El análisis de resultados de reasociación de DNA (Leutwiler *et al.*, 1984) y de clonas genómicas escogidas aleatoriamente (Pruitt y Meyerowitz, 1986) indican que el genoma nuclear de *Arabidopsis* tiene un bajo contenido de secuencias repetidas: 10-15 % del genoma es DNA altamente repetido, 7.5 % está comprendido de repeticiones en tandem de secuencias codificadoras de RNA ribosomal; y tan sólo el 1% pueden ser repeticiones dispersas. El DNA está es organizado en cinco cromosomas y recientemente se determinó la secuencia completa del genoma de *Arabidopsis*, siendo el número total de genes de 25, 498 (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

2.3.3 Transformación de *Arabidopsis*

La transformación genética vegetal fué iniciada y desarrollada en la década de los ochentas, gracias a la convergencia de progresos constantes en los protocolos para regeneración de cultivo de tejidos, técnicas moleculares dando lugar a genes marcadores expresados correctamente después de la transferencia en células vegetales y en la diversidad de métodos de transferencia de DNA.

Arabidopsis thaliana puede ser transformada a través de la entrada directa de DNA en protoplastos (Damm *et al.*, 1989) ó después de la cocultivación de hojas o raíces con *Agrobacterium tumefaciens* (Valvekens *et al.*, 1988). Es también posible transformar esta especie aplicando directamente *A. tumefaciens* a la planta y recuperando transformantes en la progenie. El primer método "in-planta", fué descrito por Feldmann y Marks en 1987 y consistió en la imbibición de semillas con *A. tumefaciens*. Otro procedimiento de transformación de la planta entera es el de Chang *et al.*, (1990) en el cual las inflorescencias jóvenes son cortadas y las superficies dañadas son inoculadas con *A. tumefaciens*. Estos procedimientos ofrecen dos ventajas principales: se evita el cultivo de tejidos y las variaciones somaclonales y se requiere de poco tiempo para obtener individuos totalmente

transformados. Sin embargo, la frecuencia de transformantes en la progenie de tales plantas inoculadas es relativamente baja y muy variable. El método más utilizado actualmente es el de infiltración, propuesto por Bechtold *et al.*, (1993) es más eficiente, en el cual plantas adultas son invertidas y sumergidas en una solución de *A. tumefaciens* conteniendo el T-DNA, y se aplica vacío por un breve período. El *A. tumefaciens* infiltra a los tejidos y libera el T-DNA del plásmido Ti conteniendo el DNA de interés en las células, donde llega a ser estable y azarosamente integrado en el genoma. Un nuevo método basado en el mismo principio fué desarrollado por Clough y Bent en 1998, ellos simplificaron el medio de infiltración y sustituyeron la infiltración al vacío por un surfactante (Silwet L-77). La frecuencia de transformantes obtenidas por éste método es casi la misma que por infiltración (casi el 0.5 % de la progenie de las plantas tratadas), aunque como con la infiltración, esta frecuencia varía con diferentes experimentos.

2.3.4 ¿Porqué *Arabidopsis* ?

En los últimos años *A. thaliana* ha ganado gran popularidad como un sistema modelo para el estudio de la biología vegetal. Su corto ciclo de vida, medida pequeña (y consecuentemente su habilidad para crecer un gran número de plantas en espacio pequeño), alta producción de semilla (alto porcentaje de viabilidad), fácil de crecer, autofertilización ó fertilización por cruza, y la facilidad para transformar y obtener mutantes en *Arabidopsis*, hacen a esta planta fácil y rápida para estudios de genética clásica (Meyerowitz, 1987). Las investigaciones con *Arabidopsis* han provisto valiosas ideas en todos los aspectos de la biología moderna, en algunos casos, aspectos sobre fisiología vegetal y bioquímica fueron primero resueltos a través de análisis genéticos y moleculares de mutantes de *Arabidopsis*. Mediante el uso de esta planta, los biólogos vegetales han observado que mecanismos comunes en eucariotes son frecuentemente primero caracterizados en sistemas animales y levaduras y después extendidos a plantas. La llegada de la genómica funcional de *Arabidopsis* y la disponibilidad de un gran número de mutantes de esta planta defectuosas en productos de genes conocidos proveen una oportunidad única para los biólogos vegetales de contribuir en los esfuerzos de investigación en una variedad de disciplinas relacionadas. Por lo que es importante que aquellos que no estén directamente involucrados en estudios de biología vegetal se mantengan al corriente de los avances en esta área.

Capítulo III

Objetivos

Objetivo general

Conocer el efecto de la delección del extremo amino-terminal del gen *SITPS1* sobre la síntesis de trehalosa en plantas transgénicas de *A. thaliana*.

Objetivos específicos

- a) Construcción de plásmidos que contengan el cDNA *SITPS1*, completo y Δ *NSITPS1* deletado del extremo amino-terminal para expresarlos en plantas de *A. thaliana*.
- b) Transformación de *A. thaliana* con los plásmidos mencionados.
- c) Obtención de plantas homocigas para los dos transgenes.
- d) Análisis molecular, bioquímico y fisiológico de las plantas homocigas.

Capítulo IV

Materiales y Métodos

4.1 Material vegetal y condiciones de cultivo

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* (ecotipo Columbia), silvestres o transformadas con el gen de la trehalosa 6-P sintasa (*SITPSI*) y con una delección del extremo amino terminal de este gen (Δ *NSITPSI*), las cuales fueron obtenidas como se describe más adelante.

Las plantas fueron crecidas en macetas con Metromix-200; y se irrigaron cada 4 días con agua y solución nutritiva durante 4 ó 6 semanas aproximadamente de acuerdo al método de Bent *et al* (1994). Quince líneas homocigas independientes de plantas transformadas fueron utilizadas para el presente trabajo. Para los diferentes experimentos de selección de homocigas, estrés salino, osmótico, frío y calor, las semillas fueron esterilizadas con etanol absoluto por un minuto y una solución de hipoclorito de sodio (40 %, v/v) y tritón X-100 (0.02 %, v/v) por 5 minutos, después se enjuagaron 5 veces con agua estéril. Las semillas fueron incubadas a 4°C por 2 días embebidas en agua, para romper la dormancia y proveer germinación uniforme. Después, las semillas se sembraron sobre cajas de petri conteniendo medio Murashige and Skoog (MS, 1962) solidificado con 0.8 % de phytagar (Gibco BRL products) y fueron incubadas a 24°C en cuartos de crecimiento con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad.

4.2 Medios y soluciones

A) Medio de Selección (por cada litro):

Mezcla de sales MS (Murashige and Skoog, 1962), 4.3 g; Vitaminas B5 1000 X (Tiamina, Piridoxina, Ac. Nicotínico, myo-inositol), 1 ml; Sacarosa, 10 g; MES, 0.5 g; phytagar, 8 g; Kanamicina 50 µg/µl para seleccionar; Timentin (Ticarcilina/Ac. clavulánico) ó Claforan (Cefotaxima), 400 µg/µl para evitar el crecimiento de *Agrobacterium*. Se disolvieron las sales, vitaminas, sacarosa y MES en agua tridestilada y posteriormente se ajustó el pH a 5.7

con KOH 1 M, se le adicionó el phytagar, y se esterilizó el medio en autoclave a 120°C durante 20 min. Se dejó enfriar hasta 50°C y se le adicionaron los antibióticos.

B) Medio de Infiltración (MI) (por cada litro):

Mezcla de sales MS, 2.2 g; Vitaminas B5 1000 X, 1 ml; Sacarosa, 50 g; MES, 0.5 g. Se disuelven en agua tridestilada y se ajusta el pH con KOH 1 M. Al final, luego de mezclar con la bacteria adicionar 0.044 µM de Benzilaminopurina (10 µl de una solución stock de 1 mg/ml en DMSO) y 200 µl de Silwet L-77.

C) Vitaminas B5 1000 X (por cada 10 ml):

Myo-inositol, 10 g; Tiamina-HCl, 0.1 g; Ácido Nicotínico, 10 mg; Piridoxina-HCl, 10 mg. Se disuelven en agua tridestilada estéril y se almacenan a -20°C.

D) Solución Nutritiva para Riego (las cantidades están dadas en mg/l):

KNO₃, 505.5; KH₂PO₄, 136.1; MgSO₄·7H₂O, 493; CaNO₃·4H₂O, 472.4; FeEDTA (Na₂EDTA·2H₂O, 37.26; FeSO₄·7H₂O, 27.8); Solución de micronutrientes (H₃BO₃, 4.328; MnCl₂·4H₂O, 2.771; CuSO₄·5H₂O, 0.1248; ZnSO₄·7H₂O, 0.2875; Na₂MoO₄·2H₂O, 0.04838; NaCl, 0.5844, CoCl₂·6H₂O, 0.00237).

4.3 Construcción de plásmidos y obtención de plantas transgénicas

El cDNA *SITPS1*, aislado de *Selaginella lepidophylla* (Zentella *et al.*, 1999), y una versión deletada del extremo amino 5' codificante de este gen, fueron clonados en el vector binario de transformación pBIN19 (Bevan, 1984), que contiene el promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor (CaMV 35 S) y la señal de poliadenilación del gen de la nopalina sintasa PA-NOS (Jefferson, 1987). Para la generación de un líder en las construcciones, se sintetizaron dos oligonucleótidos de 57 bases, de acuerdo a la secuencia líder reportada para *AtTPS1* (Blázquez *et al.*, 1998), los cuales son:

Oligo NA4:

5'CTAGAGCGGCCCGCCAGTGTGAGTAATTTAGTTTTGGTTCTGTTTTGGTGTGAG
CGTC-3'

Oligo NA5:

5'CATGGACGCTCACACCAAACAGAACCAAATAAATTACTCACACTGGCGG
CGCT-3'

Los oligonucleotidos se anillaron por separado y después se ligaron al gen y al plásmido.

Las construcciones para la sobreexpresión del gen de la TPS contenidas en la cepa de *E. coli* DH5 α , fueron mobilizadas a la cepa de *A. tumefaciens* C58C1 (pGV2260), por cruza triparental con la cepa "helper" HB101 (pRK2013) de *E. coli* portando al plásmido ó bien por electroporación. Ya mobilizadas las construcciones en *Agrobacterium*, se transformaron plantas de *A. thaliana* por medio de infiltración al vacío.

4.3.1 Método y condiciones de transformación mediado por *Agrobacterium*

Se creció un preinóculo de 5 ml de medio LB^{Kan₅₀ Rif₁₀₀} con las cepas de *A. tumefaciens* portadoras de las construcciones durante toda la noche a 28°C. Este precultivo se inoculó en 1 L de medio LB^{Kan₅₀ Rif₁₀₀} en matraces Erlenmeyer de 2 L, y se incubaron 24 h a 28°C en una incubadora agitada mecánicamente a 250 rpm. Cuando el crecimiento alcanzó una densidad óptica de 1.2-2 a 600 nm, se centrifugó el cultivo en botellas de 500 ml durante 10 min a 6000 g en una centrifuga Beckman J2-MI. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 5 ml de medio de infiltración (MI), sin Benzilaminopurina y Silwet L-77 a temperatura ambiente, posteriormente se mezclaron con 1-1.2 Lt de MI y se le adicionan la Benzilaminopurina y el Silwet L-77, evitando así la precipitación temprana de las bacterias.

El MI con la bacteria se colocó en el recipiente de vacío, y se introdujeron las macetas en forma invertida evitando que las inflorescencias se maltraten (Figura 4.1), procurando que queden bien sumergidas en el MI (es necesario haber regado muy bien las plantas previamente para evitar que la tierra absorba el MI) y se hizo vacío de 400 mm de Hg ó 16 pulg. de Hg durante 5 min. Pasado el tiempo se rompió bruscamente el vacío, se le quitó el exceso de *Agrobacterium* a las plantas, enjuagando con agua tridestilada y se colocaron en una charola con poca agua y se les hizo una cubierta de plástico (Egapack) para evitar que las plantas se deshidrataran (Figura 4.1). A los 3 o 4 días después de la transformación, las plantas se fueron descubriendo parcialmente y a los 6 o 7 días se descubrieron totalmente y se continuaron regando hasta que florecieron y empezó la formación de frutos.

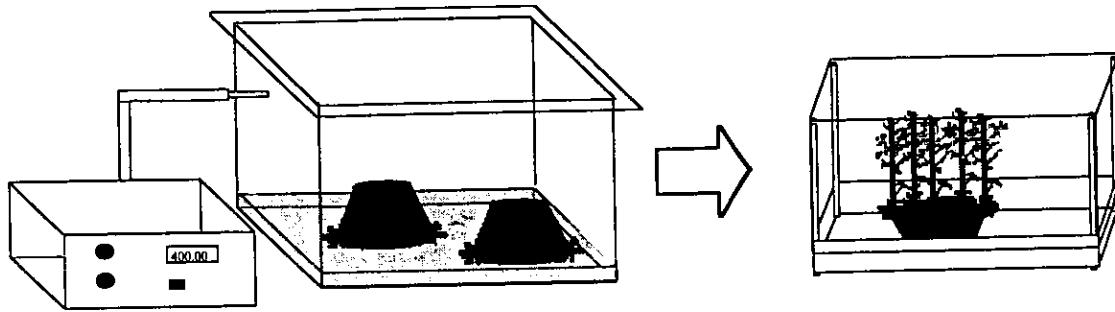


Figura 4.1 Esquema de transformación al vacío de *A. thaliana*

4.3.2 Selección de Líneas Homocigas

Después de aproximadamente 3 semanas se colectaron las semillas, se secaron por cuatro días y se almacenaron a 4°C. Las semillas de las plantas transformadas (T1) fueron germinadas y seleccionadas por su resistencia a antibiótico, con medio MS suplementado con 40 µg/µl de kanamicina y 400 µg/µl de claforan y transplantadas en metromix-200 para la obtención de semillas T2. Entre las plantas T2, las líneas que fueron homocigas con respecto al gen introducido, fueron seleccionadas examinando su resistencia a Kanamicina (100 % Kan^R) después de autopolinización (semillas T3) (Figura 4.2).

4.4 Manipulación de DNA

Las técnicas de transformación de bacterias, aislamiento de DNA de plásmidos, digestión de DNA con enzimas de restricción, y tratamiento de DNA con enzimas de modificación se llevaron a cabo con métodos de laboratorio estándar (Sambrook *et al.*, 1989).

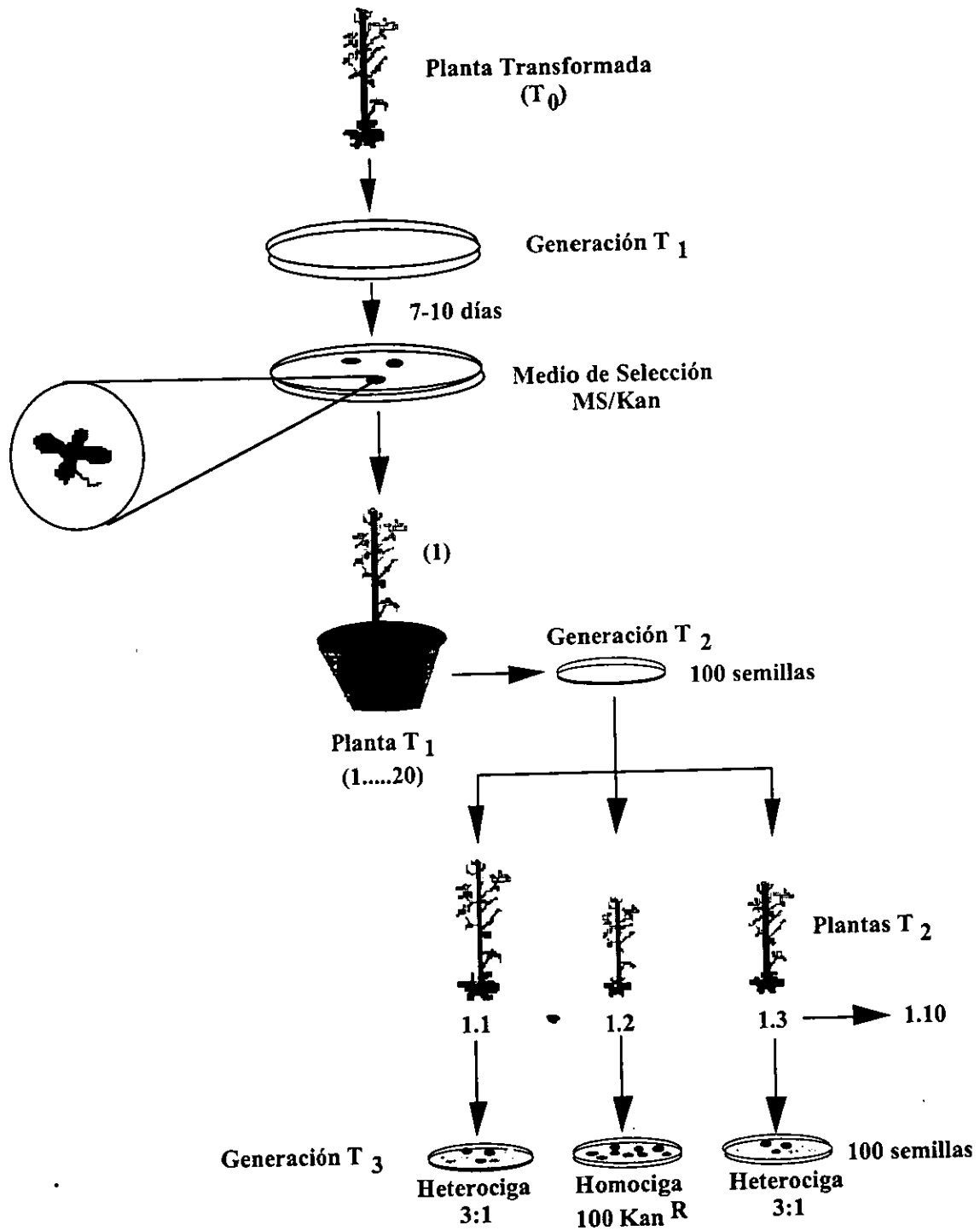


Figura 4.2 Esquema de selección de líneas homocigas

4.5 Amplificaciones por PCR

Para la amplificación por PCR, 100 mg de tejido de hojas de plantas heterocigas (T2) congeladas con nitrógeno líquido, fueron maceradas y descongeladas con 400 µl de buffer de extracción (Tris-HCl 200 mM, pH 7.5, NaCl 250 mM, EDTA 25 mM, SDS 0.5 %). Esta mezcla se agitó 30 min y se centrifugó. El sobrenadante se fenolizó dos veces con un volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (24:24:1) y una vez con cloroformo-isoamílico (24:1). Después de la precipitación con 0.1 volumen de NaOAc 3M pH 5.2 y 2 volúmenes de isopropanol, se lavó la pastilla con etanol al 70% y se resuspendió en 30 µl de agua tridestilada estéril de la cual se tomaron 2 µl para la reacción de PCR. Los oligonucleotidos utilizados para analizar la inserción del cDNA fueron los siguientes:

Pr Universal, 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3';

P35S, 5'-TATCCTTCGCAAGACCC-3';

SITPS100 5', 5'-CATGCCATGGGTCGAGGCCAGCGGTTGC-3';

SITPS600-3', 5'-CGGGGTACCTCACTTTGACTCCGAGTACTTTGC-3'.

Las amplificaciones de PCR fueron realizadas en un termociclador Perkin-Elmer P16746, usando tubos de 0.5 ml con reacciones de 50 µl conteniendo 2 µl de DNA genómico (200 ng) como templado, 1 µl de enzima Taq-polimerasa, 10 pmol de cada oligonucleótido, y 0.2 mM de una mezcla de dNTP's. El programa del termociclador inició con una desnaturalización inicial de 5 min a 94°C, seguido por 35 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 68°C y una incubación final de 10 min a 72°C. Se tomaron 15 µl de cada reacción para ser analizados en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml).

4.6 Amplificaciones por RT-PCR

Las plántulas T3 de dos semanas (500 mg de tejido) fueron congeladas en nitrógeno líquido y maceradas. Fueron después descongeladas con la adición de 400 µl de buffer de extracción (NaCl 0.1 M, Tris-HCl 10 mM, pH 7.4, EDTA 1 mM, SDS 1 %, β-Mercaptoetanol 1 %) y 200 µl de fenol-cloroformo-isoamílico (24:24:1). Varias extracciones con fenol fueron realizadas hasta que la interfase quedó limpia.

Después de una precipitación con 1/10 de volúmen de NaOAc 3 M pH 4.8 y dos volúmenes de etanol, se volvió a precipitar el RNA toda la noche a 4°C con LiCl 2 M. Al día siguiente el RNA fué resuspendido en agua y de nuevo precipitado con 1/10 de volúmen de NaOAc 3 M pH 4.8 y dos volúmenes de etanol. Después se lavó con etanol al 70 % se resuspendió en 30 µl de agua.

El DNA genómico fué removido con 10 U de DNAsa I libre de RNAsa (GIBCO BRL products) e incubada por 15 min a 37°C y después 10 min a 75°C para inactivar la reacción. La síntesis de cDNA fué realizada con 5 µg de RNA total como templado, 2 pmol de Oligo dT en una reacción de 12 µl, ésta mezcla fué incubada 10 min a 75°C y puesta en hielo inmediatamente. Posteriormente se le adicionó 0.5 mM de cada dNTP, 10 mM de DTT, 40 U de inhibidor de RNA y se mezcló con cuidado y se incubó 2 min a 42°C. Finalmente se le adicionó 200 U de transcriptasa reversa Superscript II (GIBCO BRL products) y se incubó 50 min a 42°C, posteriormente la enzima fué inactivada 15 min a 75°C. Los oligos utilizados así como el programa de amplificación, fueron los mismos que para la amplificación por PCR. Al igual que en la amplificación por PCR, 15 µl de cada reacción fueron analizados en un gel de agarosa al 1 %, teñido con bromuro de etidio (10 mg/ml). Oligos utilizados como control constitutivo:

OLLY23, 5'-TCCCAGAATCGCTAAGATTGCC-3'

OLLY42, 5'- CCTTCCCTTAAGCTCTG-3'

OLLY23 y OLLY42 amplifican un fragmento de 478 pb de *APT 1* (Adenosin fosfotransferasa)

4.7 Pruebas de estrés salino y osmótico

Plántulas T3 homócigas fueron germinadas sobre discos de tela en cajas de petri (92 mm x 16 mm) conteniendo medio MS con 0.8 % de phytagar, bajo las condiciones de crecimiento antes mencionadas. Al cabo de dos semanas, el filtro de tela se colocó en cajas de petri conteniendo MS líquido con 0.2 M, 0.3 M, 0.6 M de NaCl y 1 M, 1.5 M, 2 M de sorbitol, e incubando 24 h a 24°C y al cabo de este tiempo se enjuagó el filtro con MS y se colocaron en cajas con MS sólido dejando cinco días bajo condiciones de crecimiento para observar sus efectos.

4.8 Pruebas de frío y choque térmico supraóptimo

Para los tratamientos de frío, 15 plántulas T3 homocigas de cuatro líneas independientes transgénicas además del control y silvestre fueron germinadas dos semanas sobre filtros de tela en cajas de petri con MS sólido fueron incubadas a 4°C durante 24 horas y finalmente incubadas a 24°C por una semana.

De igual forma 15 plántulas T3 homocigas de cuatro líneas independientes transgénicas además del control y silvestre fueron germinadas dos semanas sobre filtros de tela en cajas de petri con MS sólido fueron sometidas a choque térmico con y sin pretratamiento de 34°C antes de situar las cajas de petri en baños de agua por 1 h a las siguientes temperaturas: 42°C, 46°C y 48°C. Pasado el tiempo del choque térmico, se incubaron las cajas de petri a 24°C durante una semana.

4.9 Determinación del contenido de trehalosa

Para la determinación del contenido de trehalosa en las digerentes plantas transgénicas, tejido de plantas de 3 ó 4 semanas, en presencia o ausencia de Validamicina A, fue molido en nitrógeno líquido y liofilizado. El contenido de trehalosa fue determinado mediante HPLC (Carbopak PA-1, Sunnyvale, CA, USA) con un detector de pulso electroquímico Dionex y usando 4 mM de NaOH como buffer de elución. (estas determinaciones fueron llevadas a cabo en la Universidad Católica de Leuven, Bélgica por el M.C. Nelson Avonce). Después de liofilizar los tejidos, se pesaron 50 mg de tejido de cada línea y se llevaron a un volumen final de 1 ml (con agua). Las muestras se hirvieron por 10 min a 95°C y se centrifugaron 15 min a 14000 g para separar el tejido de la planta y se tomó el sobrenadante. De éste, se tomaron 200 µl de cada muestra y se adicionaron a la columna previamente empacada y equilibrada. Para empacar la columna se tomó una pipeta pasteur y se colocó un poco de fibra de vidrio en el fondo. Posteriormente se le adicionaron 5 cm de suspensión ácida de resina de intercambio iónico DOWEX, seguida de otros 5 cm de la misma resina. Finalmente se 5 veces con 1 ml de agua. Una vez que se adicionó la muestra a la columna, todo el eluido se colectó. El volumen de la muestra es de 200 µl, y se diluye con 6 veces el volumen original de agua. A esto se le ajustó el pH entre 5-6, usando una solución de NaOH 1M (aprox. 4 µl). Posteriormente se adiciona azida de sodio a una concentración final de 0.02% para evitar contaminaciones. Después las muestras se congelaron para su análisis en el HPLC.

Capítulo V

Resultados y Discusión

5.1 Clonación del cDNA *SITPS1* de *Selaginella lepidophylla* y movilización hacia *Agrobacterium tumefaciens*

Se empezó por clonar en el vector pBin 19-NOS, el cual ya contenía la secuencia señal de poliadenilación del gen de la nopalina sintasa (PA-NOS), el promotor CaMv 35S proveniente de un plásmido derivado del PUC (p35S-NOS) teniendo de esta manera un plásmido de aproximadamente 13 Kb (Figura 5.1). En este plásmido se llevaron a cabo las clonaciones del gen *SITPS1* (gen completo) y de la delección de éste de 300 pb Δ *NSITPS1* (gen deletado), junto con el líder del gen *AtTPS1*.

Para la generación de un líder en las construcciones, se sintetizaron dos oligonucleótidos de 57 bases, de acuerdo a la secuencia líder reportada para *AtTPS1* (Blazquez *et al.*, 1998). Los oligonucleótidos se anillaron por separado y después se intentó ligar al mismo tiempo el líder, el gen y el plásmido (una ligación de tres puntos). Después de varias pruebas sin éxito, se cambió la estrategia, realizando primero la ligación del líder con el gen (por su sitio Nco I) y después se intentó la ligación de éste producto con el vector pBin35S-NOS. Se realizó esta estrategia tanto para el *SITPS1* como para el Δ *NSITPS1*, lograndose obtener la construcción con el gen completo (Figura 5.2).

Mientras se volvía a repetir el experimento anterior, con el objeto de clonar Δ *NSITPS1*, se decidió intentar al mismo tiempo una nueva estrategia. Sacando ventaja de que se tenía clonado el gen *AtTPS1* completo en el plásmido pBSK, y que esta construcción tiene los sitios de restricción Xba I y Nco I, se intentó la clonación del Δ *NSITPS1* en este vector. Se separó la región que lleva al gen *AtTPS1* (Nco I-KpnI), y en el resto del vector se clonó el gen Δ *NSITPS1* de *S. lepidophylla*. De 24 colonias analizadas, se obtuvieron 13 positivas. Se tomó una de estas clonas y se digirió con Xba I-Kpn I con la finalidad de obtener el gen Δ *NSITPS1* fusionado al líder y después se intentó clonar en el vector pbin35S-NOS para finalmente obtener la construcción con el gen Δ *NSITPS1* (Figura 5.3).

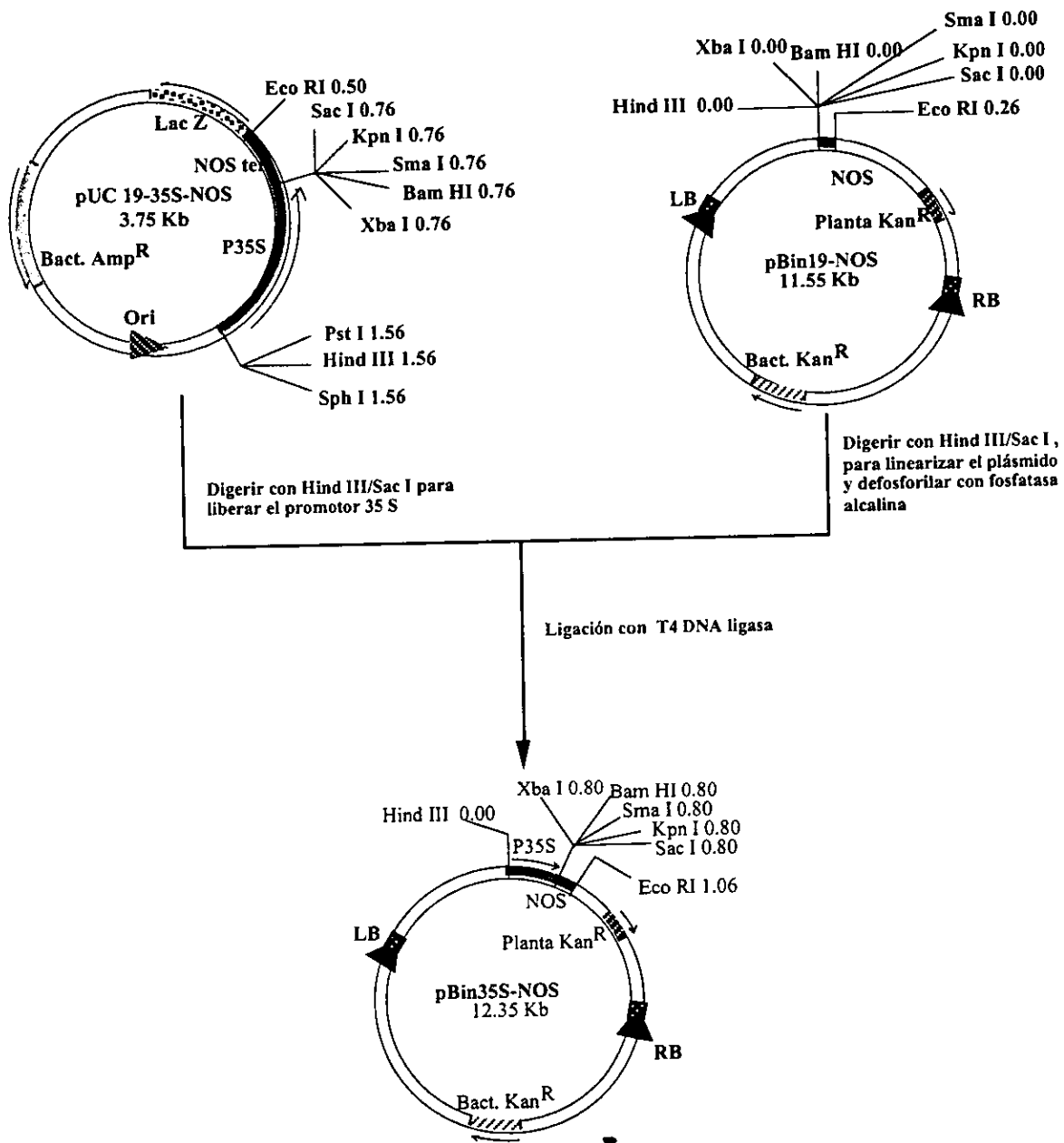


Figura 5.1 Estrategia de clonación del promotor 35S en el pBin19-NOS.

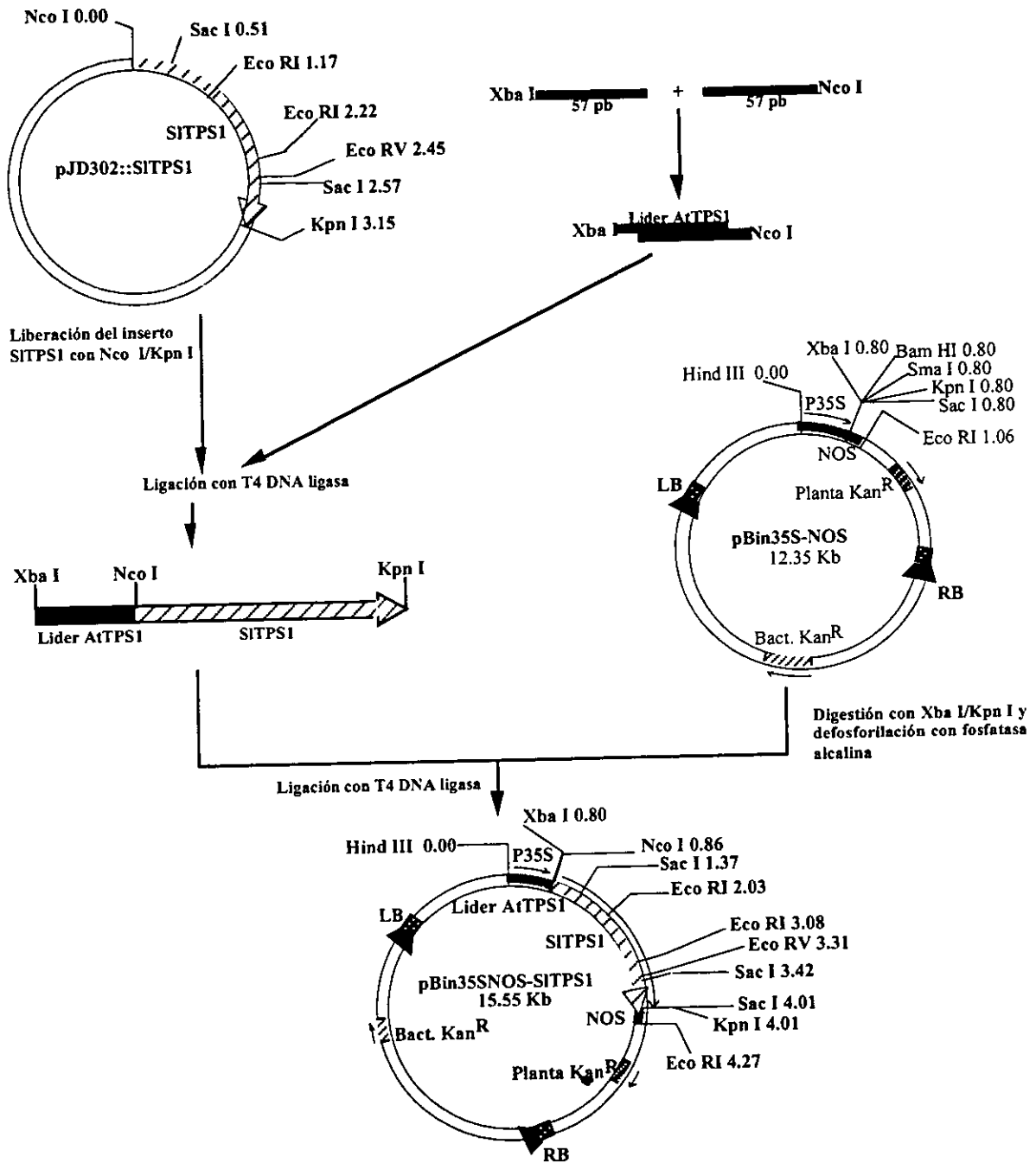


Figura 5.2 Estrategia de clonación de *SITPS1* en *pBin35SNOS*

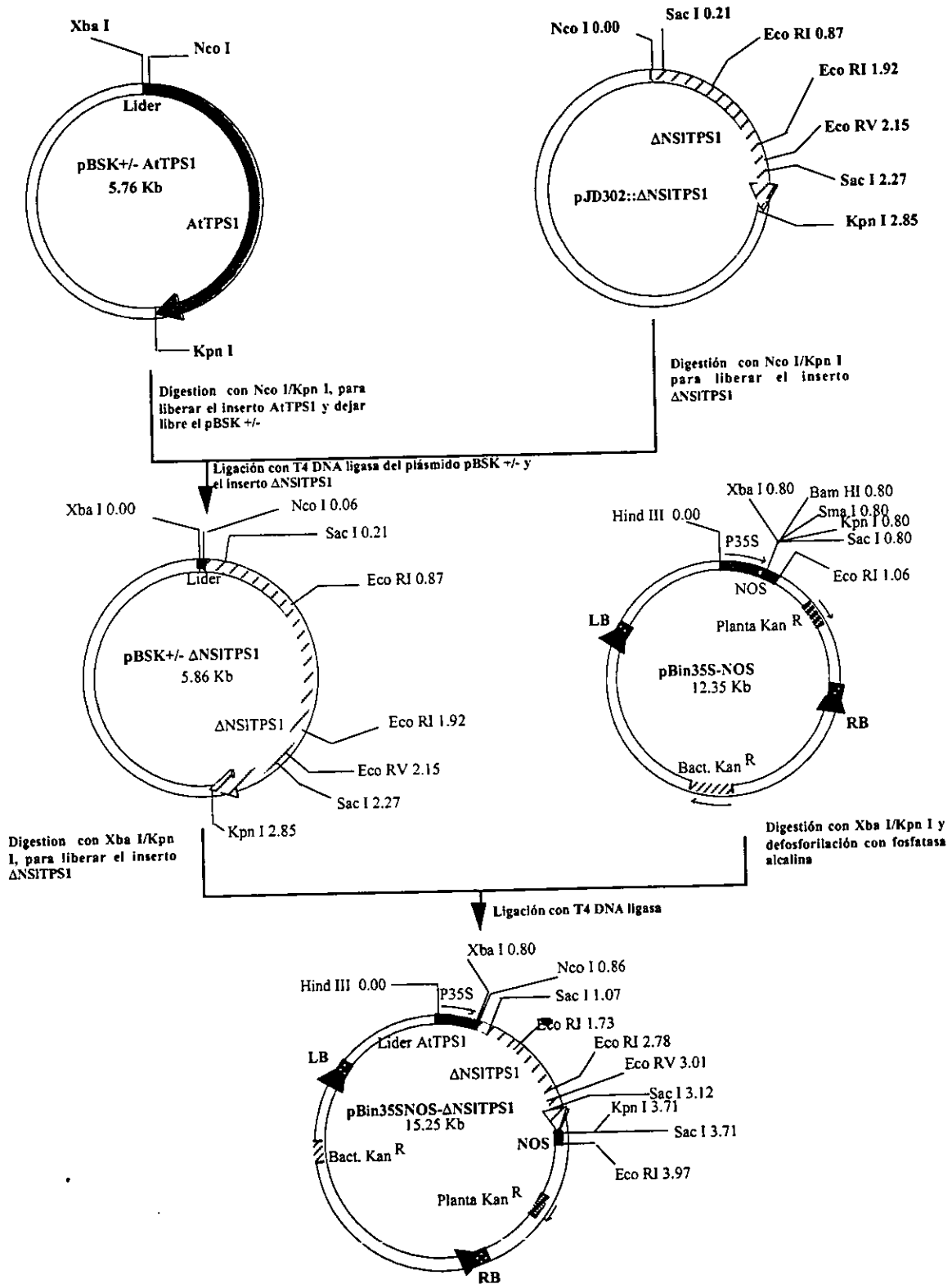


Figura 5.3 Estrategia de clonación del $\Delta NSITPS1$ en pBin35SNOS

La figura 5.4 muestra el análisis con enzimas de restricción de las construcciones con el gen *SITPS1* y el gen Δ *NSITPS1*. Como puede observarse, cuando se digieren con *Xba* I/*Kpn* I y con *Nco* I/*Kpn* I para liberar el líder-gen y el gen respectivamente, se obtienen fragmentos en los que la única diferencia entre las dos construcciones son 300 pb menos en el caso de la construcción con la delección. De igual manera, al ser digeridas con *Eco* RV/*Sac* I se obtienen fragmentos de 661 pb para la construcción con el gen *SITPS1* y 361 pb para la construcción con el gen Δ *NSITPS1*.

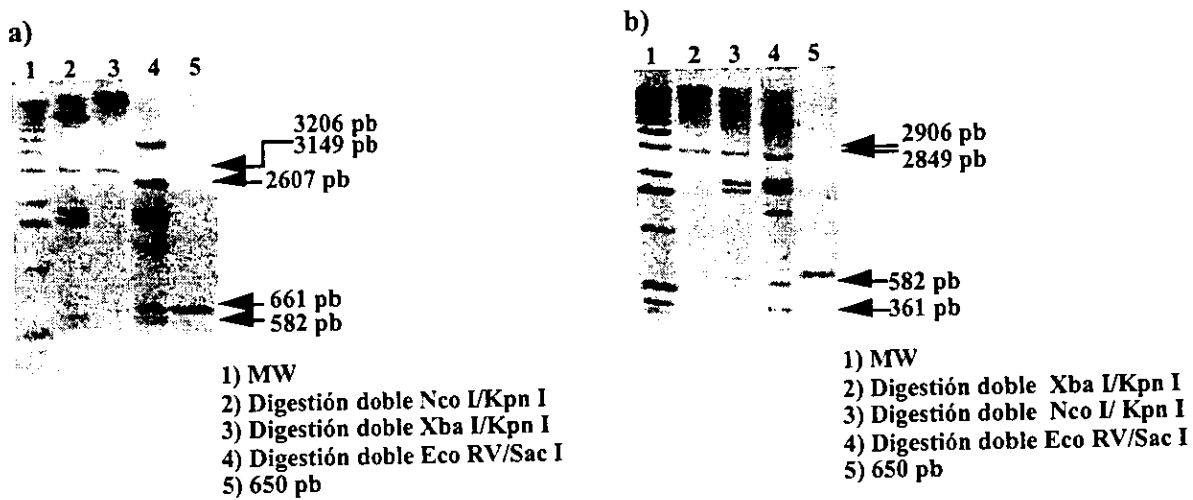


Figura 5.4 Análisis por restricción de las construcciones con el gen *SITPS1*: a) Análisis del gen completo (*SITPS1*), b) Análisis del gen con la delección amino (Δ *NSITPS1*). MW es el marcador de peso molecular de 1 kb

Las construcciones contenidas en la cepa DH5 α fueron mobilizadas hacia la cepa C58C1 (pGV2260) de *A. tumefaciens*, mediante cruce triparental y electroporación. De las colonias obtenidas se analizaron 3 clonas para cada construcción haciendo digestiones simples con *Eco* RI y dobles con *Eco* RV-*Sac* I, para corroborar el patrón de restricción en las construcciones (Figura 5.5). Se obtuvieron los dos fragmentos esperados para la digestión con *Eco* RI (1055 y 1186 pb), tanto para la construcción con el gen *SITPS1* como para la construcción con el gen Δ *NSITPS1*. Con *Eco* RV-*Sac* I, como se había discutido anteriormente la única diferencia esperada entre las dos construcciones era obtener un fragmento de 661 pb para el gen *SITPS1* y 361 pb para el gen Δ *NSITPS1*. La figura 5.6 muestra el patrón de restricción en las dos construcciones realizadas.

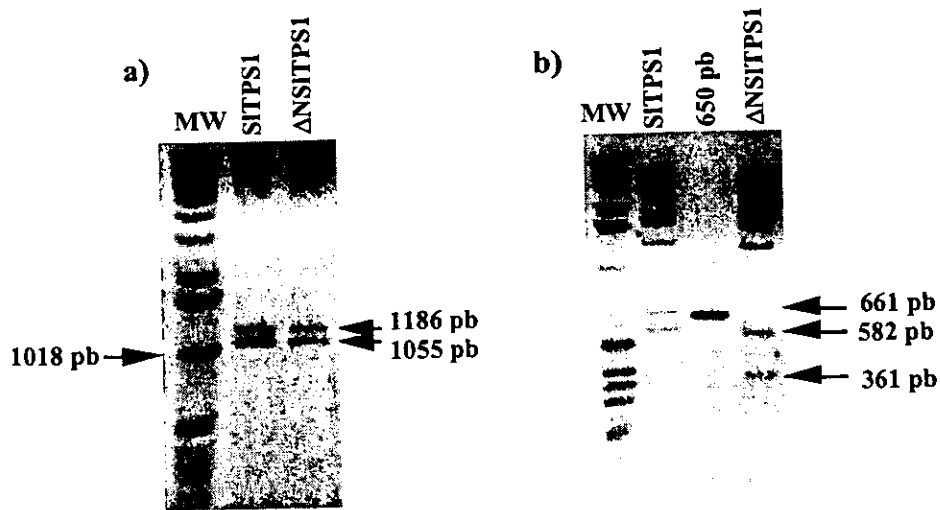


Figura 5.5 Patrón de restricción de las construcciones en *A. tumefaciens*. a) Digestión simple con Eco RI, b) Digestión doble con Eco RV/Sac I. MW es el marcador de peso molecular de 1 kb

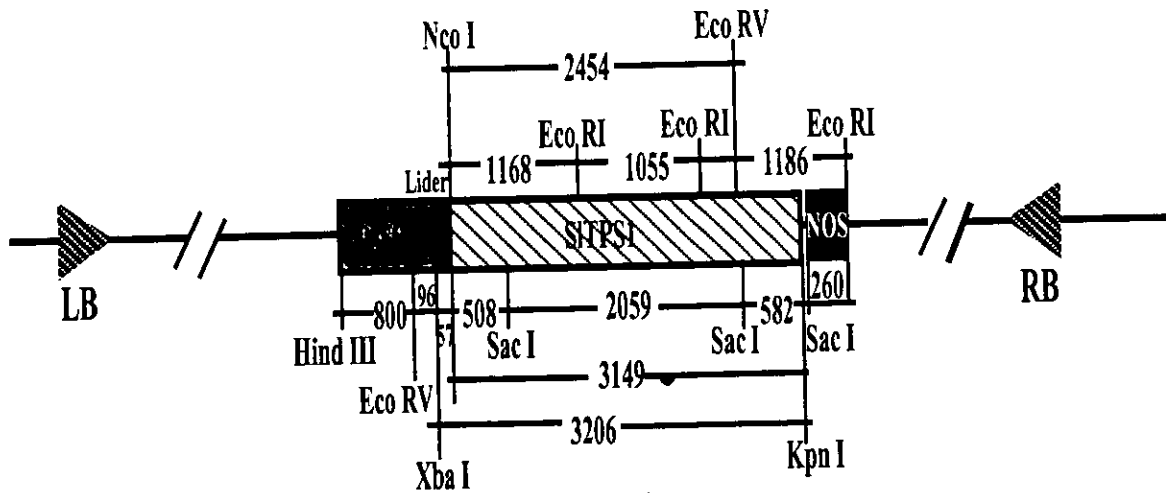


Figura 5.6 Patrón de restricción detallado de la construcción con *SITPS1*: Las distancias están dadas en pb; las diferencias en las distancias entre las construcciones con el gen completo y con la deleción, son 300 pb menos en la deleción hacia el extremo amino-terminal.

5.2 Transformación de *Arabidopsis thaliana* con el cDNA *SITPS1* de *Selaginella lepidophylla*

Plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas fueron generadas con las construcciones antes mencionadas mediante infiltración al vacío mediado por *A. tumefaciens*. De veinticinco plantas (plantas T0) transformadas para cada construcción se obtuvieron 23 plantas (plantas T1) para la construcción con el gen *SITPS1*, 7 para la construcción con el gen Δ *NSITPS1* y 25 con el vector solo, que fueron resistentes a kanamicina. Esta diferencia en la cantidad de plantas transformadas con Δ *NSITPS1*, podría deberse al efecto que este gen tiene en plantas, ya que se repitieron varias transformaciones con ésta construcción sin obtener mayor eficiencia en la transformación. De estas plantas resistentes a kanamicina (Kan^{R}) fueron obtenidas plantas T2 por autopolinización de cada una de estas plantas T1, las cuales fueron también resistentes a kanamicina. Las plantas T2 fueron otra vez autopolinizadas para producir las semillas T3.

Se establecieron líneas homocigas, seleccionando plantas T2 que exclusivamente produjera plantas T3 que fueran resistentes a kanamicina. De estas, solo se escogieron 10 plantas homocigas para el gen *SITPS1*, 5 para el gen Δ *NSITPS1*, y 1 para la construcción con el vector vacío como control. El hecho de tener únicamente 5 líneas homocigas del gen Δ *NSITPS1*, se debió a que las dos líneas faltantes (Δ NS1 2 y Δ NS1 4) fueron líneas T2 estériles, es decir, no produjeron semilla y por lo tanto no se pudieron obtener líneas homocigas. Las plantas de las semillas T3 de las líneas homocigas de las diferentes construcciones se utilizaron para los análisis de fenotipo, frío, choque térmico, pruebas de estrés y determinación de trehalosa.

5.3 Análisis molecular de plantas transgénicas

Para verificar la presencia del transgen mediante la técnica de PCR se utilizó DNA genómico de plantas T2. Se utilizaron oligonucleótidos internos del gen (ver figura 5.7), para obtener fragmentos de 1500 pb en los casos para el gen *SITPS1* y Δ *NSITPS1* y en el caso del control (solamente el vector vacío) se utilizaron los oligonucleótidos del 35S y del extremo 3' presentes en todas las construcciones (ver figura 5.8) que generan una banda de 350 pb. La planta silvestre de se probó con los oligonucleótidos internos del gen *SITPS1*, para corroborar que el gen endógeno (*AtTPS1*) no se estuviera amplificando en las líneas

transgénicas. De esta forma se comprobó que en nuestras líneas solo se estaba amplificando el transgen. De las 10 plantas resistentes a kanamicina analizadas del gen *SITPS1*, todas mostraron la presencia del transgen, de igual forma ocurrió con las 7 líneas del gen Δ *SITPS1*. Del control sólo se analizaron 5 líneas, de las cuales también se obtuvo el fragmento esperado siendo seleccionada únicamente una sola línea como control. La figura 5.9 muestra los resultados de los análisis mediante la técnica de PCR.

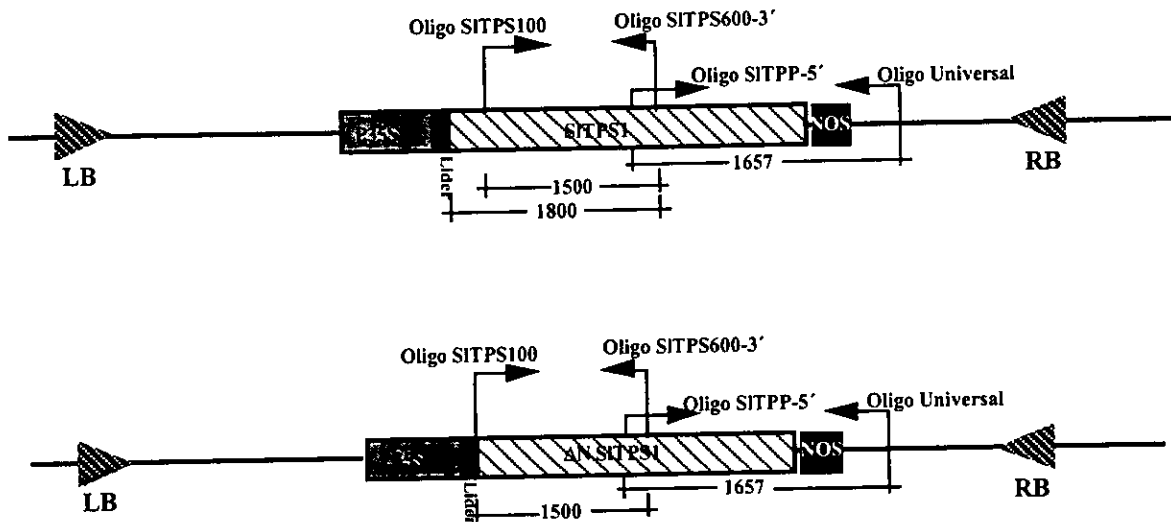


Figura 5.7 Oligonucleótidos internos en el gen *SITPS1* y Δ *SITPS1*



Figura 5.8 Oligonucleótidos utilizados en el plásmido control (pBin35S-NOS)

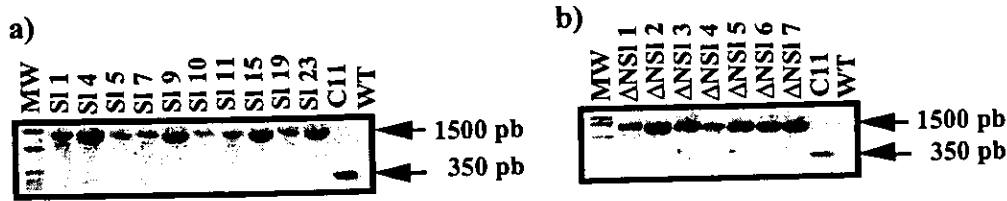


Figura 5.9 Análisis por PCR de líneas transgénicas. a) Líneas de la construcción con el gen *SITPS1*; b) Líneas de la construcción con el gen Δ *NSITPS1*

Por otra parte, para analizar la expresión del gen *SITPS1*, se realizaron reacciones de RT-PCR de líneas transgénicas homocigotas T3, a diferentes ciclos, esto con la finalidad de ver si se mostraba algún cambio en el patrón de expresión en las diferentes líneas transgénicas. Al parecer en algunas líneas el transcrito se expresa antes que en otras, como se puede apreciar (Figura 5.10), en la línea SI 15.8 se ve el transcrito desde los 20 ciclos, alcanzando su máximo hasta los 30 ciclos, a partir de los 25 ciclos se puede observar el transcrito de otras líneas, la mayoría de estas líneas alcanzan su máximo a los 35 ciclos. En el caso de las líneas del gen Δ *NSITPS1*, solamente en las líneas Δ NSI 5.4 y Δ NSI 7.1 se observa el transcrito a partir de los 30 ciclos, alcanzando su máximo a los 40 ciclos, el transcrito de las demás líneas se observó a partir de los 35 ciclos y de igual forma alcanzan su máximo a los 40 ciclos. Sorprendentemente, sólo en un caso (línea Δ NSI 7.1) se observó correlación entre la expresión del transgen y el contenido de trehalosa. En ésta línea si se presentó mayor contenido de trehalosa, y las alteraciones morfológicas fueron más marcadas. Una posible explicación con respecto a la no correlación entre el contenido de trehalosa y la expresión del transgen, es el hecho de que aunque la expresión del gen sea temprana, no genera suficiente proteína para sintetizar una cantidad elevada de trehalosa. En el caso en donde la expresión es posterior tal vez si hay suficiente proteína para producir más cantidad de trehalosa. Por el momento no es posible saber que tanta proteína se esta generando en las diferentes líneas para poder decir con certeza si esta es la causa de la discrepancia en la correlación entre la expresión del transcrito y el contenido de trehalosa, ya que no se cuenta con un anticuerpo contra *SITPS1*. Otra explicación a esta discrepancia, puede ser que debido a que los análisis de RT-PCR fueron realizados con plántulas de dos semanas y las determinaciones de trehalosa en plantas adultas, se esté dando una degradación de trehalosa posterior a su desarrollo, y debido a ello se encontró un menor contenido de trehalosa aunque su expresión sea temprana.

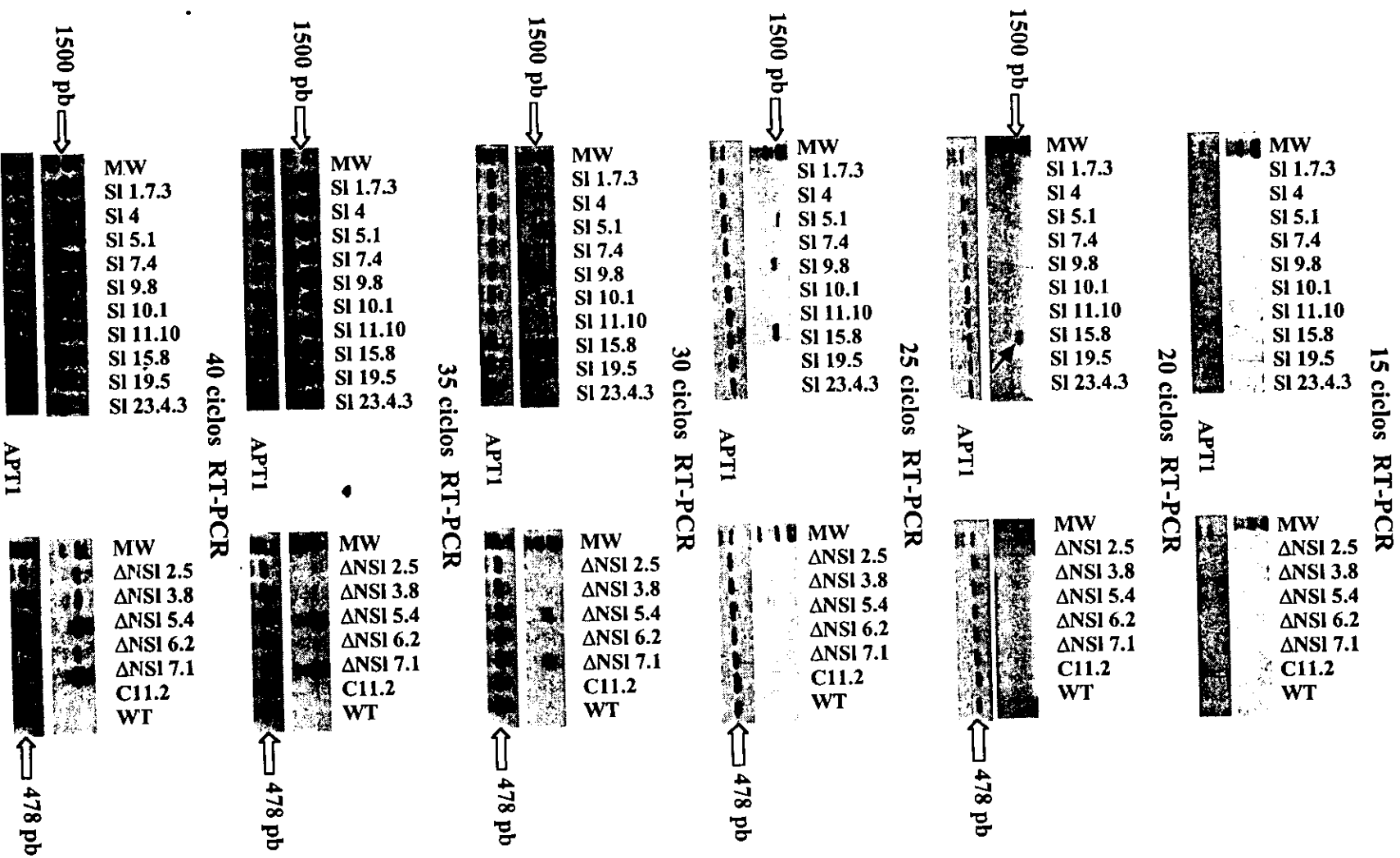
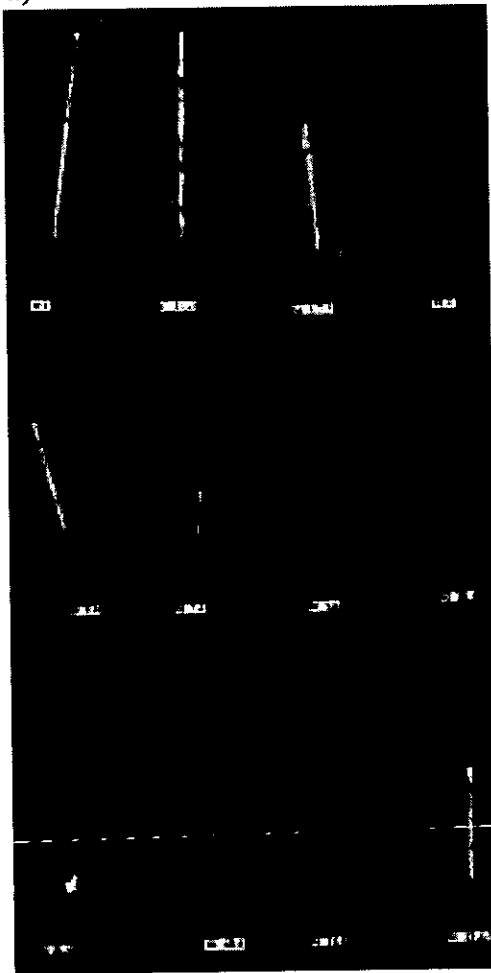


Figura 5.10 Patrón de expresión de líneas transgénicas T3 mediante RT-PCR.

5.4 Alteraciones Morfológicas

Preliminarmente se habían observado alteraciones morfológicas y alteraciones en el crecimiento de las plantas transgénicas, esto en la primera generación (líneas T2), para corroborar si esto ocurría en las plantas homocigas se crecieron las plantas T3 en las mismas condiciones de luz, riego, y temperatura. De igual forma se observó también una alteración en el fenotipo de las plantas, en general, estas alteraciones van desde una disminución en la altura, coloración morada en las hojas y en algunos casos en toda la planta, un retardo en el desarrollo (figura 5.11, 5.12), semillas y silicuas estériles, así como la aparición de una inflorescencia particular la cual la llamamos "rara" (figura 5.13), apareciendo casi al final del desarrollo de la planta. Las figuras 5.14 y 5.15 resumen también algunas de las características encontradas en cada una de las líneas homocigas analizadas.

a)



b)

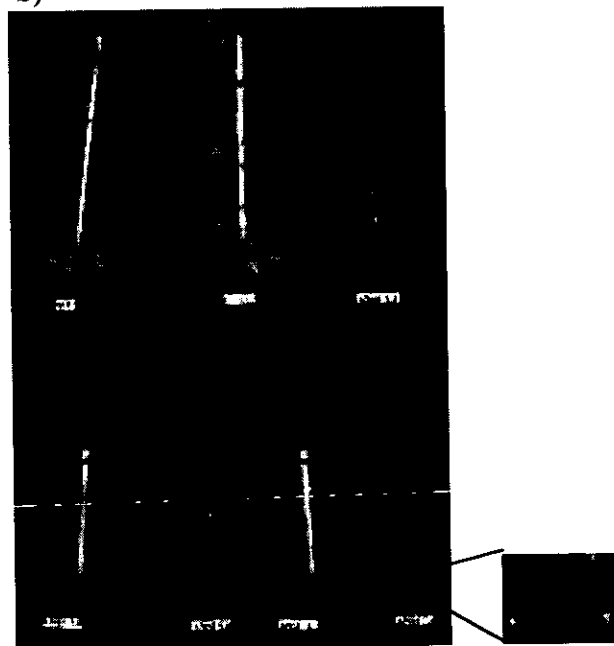


Figura 5.11 Diferencia en altura en líneas, a) con el gene completo; b) con el gene deletado

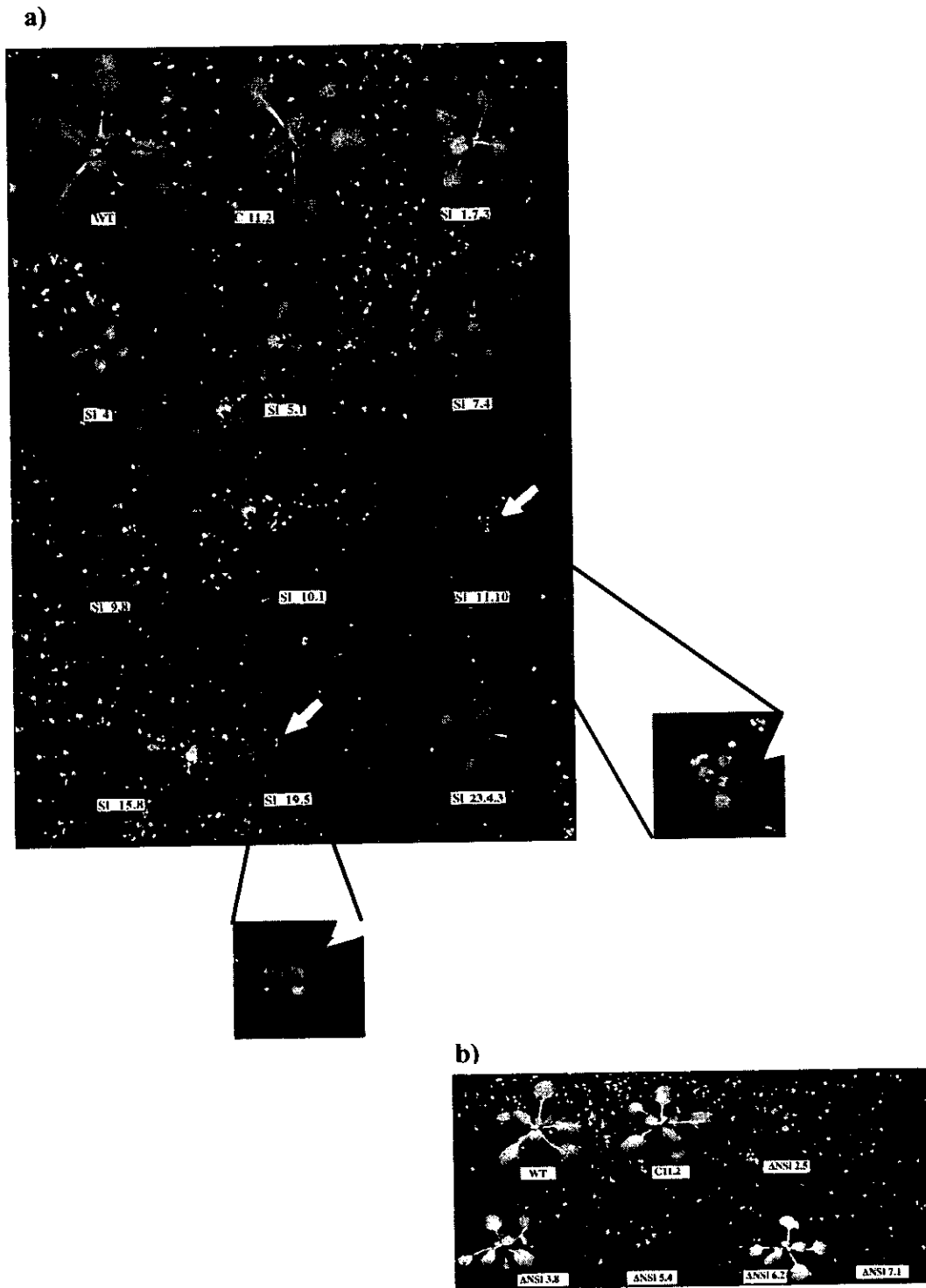


Figura 5.12 Variación en el tamaño y coloración en líneas transgénicas, a) con el gene completo, b) con el gene deletado.



Figura 5.13 Deformación de inflorescencias ("raras") encontradas en algunas de las líneas transgénicas.

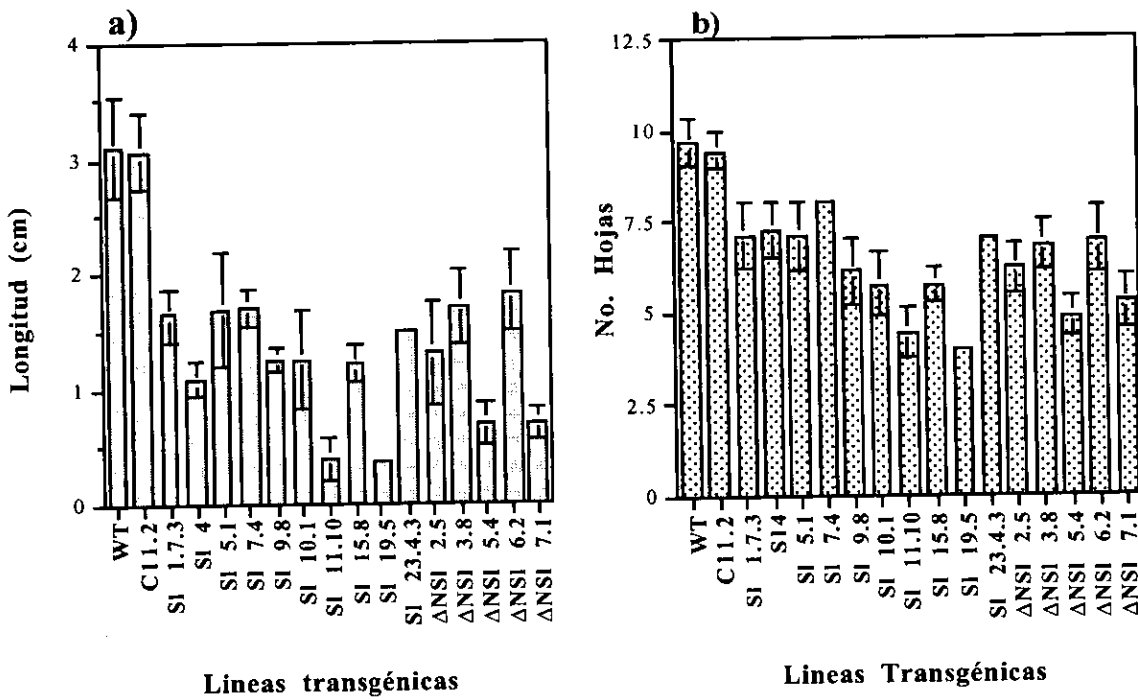


Figura 5.14 Variación del tamaño de a) roseta, y b) número de hojas, en las diferentes líneas transgénicas. Los datos mostrados son el promedio de 14 plantas de cada línea transgénica de 17 días de edad, crecidas en macetas, bajo las mismas condiciones de luz, temperatura y riego. Las barras de error indican la desviación estándar.

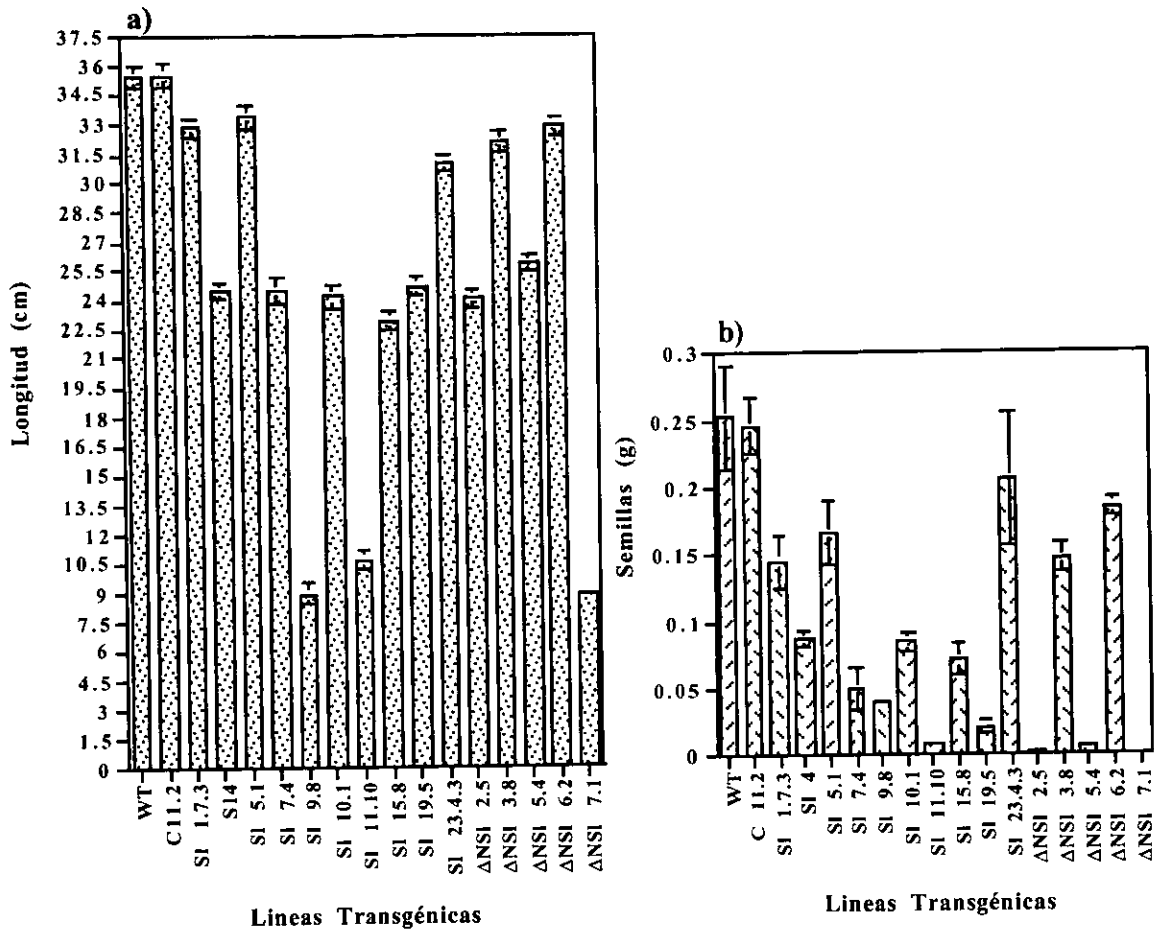


Figura 5.15 Variación del tamaño de a) inflorescencias y b) producción de semillas en las diferentes líneas transgénicas. Los datos mostrados son el promedio de 14 plantas de cada línea transgénica de 64 días de edad, crecidas en macetas, bajo las mismas condiciones de luz, temperatura y riego. Las barras de error indican la desviación estándar.

Existe una correlación entre el contenido de trehalosa y la alteración del desarrollo en las líneas SI 7.4, SI 9.8, SI 11.10, SI 15.8 y Δ NSI 7.1, no así en líneas como Δ NSI 2.5 y Δ NSI 5.4, en donde a pesar de su alterado desarrollo, el contenido de trehalosa no es más que la silvestre y control. Una posible explicación de esta discrepancia puede ser que en las líneas en las cuales no existe correlación entre las alteraciones morfológicas y el contenido de trehalosa (Δ NSI 2.5 y Δ NSI 5.4), la trehalosa alcance su nivel máximo en etapas tempranas del desarrollo de estas líneas, y como se había mencionado anteriormente, las cuantificaciones de trehalosa se determinaron en etapa adulta de la planta, tal vez a esta

edad, la mayoría de la trehalosa ya ha sido degradada ó utilizada por la planta, causando un efecto tóxico, por lo cual al determinar la cantidad de trehalosa, esta sea menor que en otras líneas. Por otra parte, aunque se esperaría que las fosfatasa presentes en el citosol, sean lo suficientemente capaces para producir trehalosa, no es descartable que aún pequeñas cantidades de trehalosa 6-fosfato ocasionen este alterado desarrollo en la planta, además la trehalosa ha resultado ser tóxica para *Arabidopsis* cuando es aplicada exógenamente (Müller, et al, 1999), nuestros datos sugieren que la producción de trehalosa en planta tiene un efecto negativo sobre el crecimiento y desarrollo cuando el gene *SITPS 1* es expresado constitutivamente. Estas alteraciones correlacionan con algunas encontradas en plantas transgénicas de tabaco sobreexpresando la TPS de *E. coli* y levadura, conteniendo además una acumulación de trehalosa (Hölmstrom et al, 1996; Goddijn et al, 1997; Romero et al, 1997), dentro de estas características destacan la reducción en el tamaño de las plantas y la presencia de hojas lanceoladas.

5.5 Acumulación de trehalosa en presencia de Validamicina A

La actividad de las trehalasas, se piensa, pueden proteger a las plantas de los efectos tóxicos de la acumulación de la trehalosa, la cual puede encontrarse en el suelo o bajo interacción con hongos o insectos. Para evaluar el efecto de la actividad de la trehalasa, sobre la acumulación de trehalosa en líneas transgénicas que llevan el gene *SITPS 1* y la delección amino-terminal de este, así como, determinar si efectivamente hay un aumento del contenido de trehalosa en las líneas que llevan la delección, plantas adultas, fueron crecidas en el cuarto de crecimiento (16 h luz, 8 h oscuridad, 24 ° C), durante 4 ó 5 semanas dependiendo de su desarrollo (ya se había discutido anteriormente, que hay un retraso en el crecimiento de las plantas) e incubadas 24 h en presencia de agua y de 0.01 mM del antibiótico Validamicina A, el cual es un inhibidor de la actividad de la trehalasa, y se determinó el contenido de trehalosa en las muestras mediante HPLC (Leuven, Bélgica).

En la figura 5.16 se muestra un ejemplo del cromatograma de la determinación de trehalosa contra el estandar, comprobando que el pico cuantificado es referente a trehalosa. De las 10 líneas homocigas que llevan el gene completo, 5 de estas exhiben cantidades de hasta 3.46 mg/g PS, en ausencia del inhibidor (figura 5.17 a), cuando son incubadas en presencia de Validamicina (figura 5.17 b), hay un aumento significativo en 8 de estas líneas alcanzando hasta 4.69 mg/g PS, alrededor de 15 veces más trehalosa que el control (vector solo) y WT.

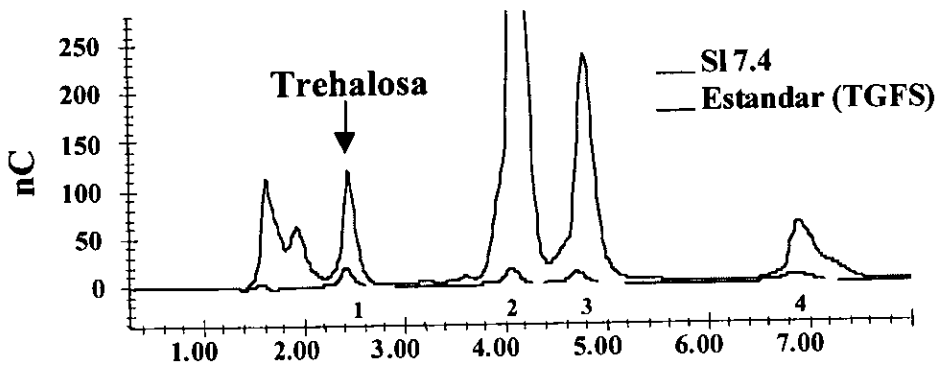


Figura 5.16 Determinación de trehalosa mediante HPLC. El cromatograma muestra el perfil de respuesta de a) un extracto de la línea transgénica SI 7.4 incubada en presencia de agua conteniendo 3.46 mg/g PS y un estándar conteniendo concentraciones conocidas de varios azúcares. La solución estandar contiene trehalosa (1), Glucosa (2), Fructosa (3) y sacarosa (4).

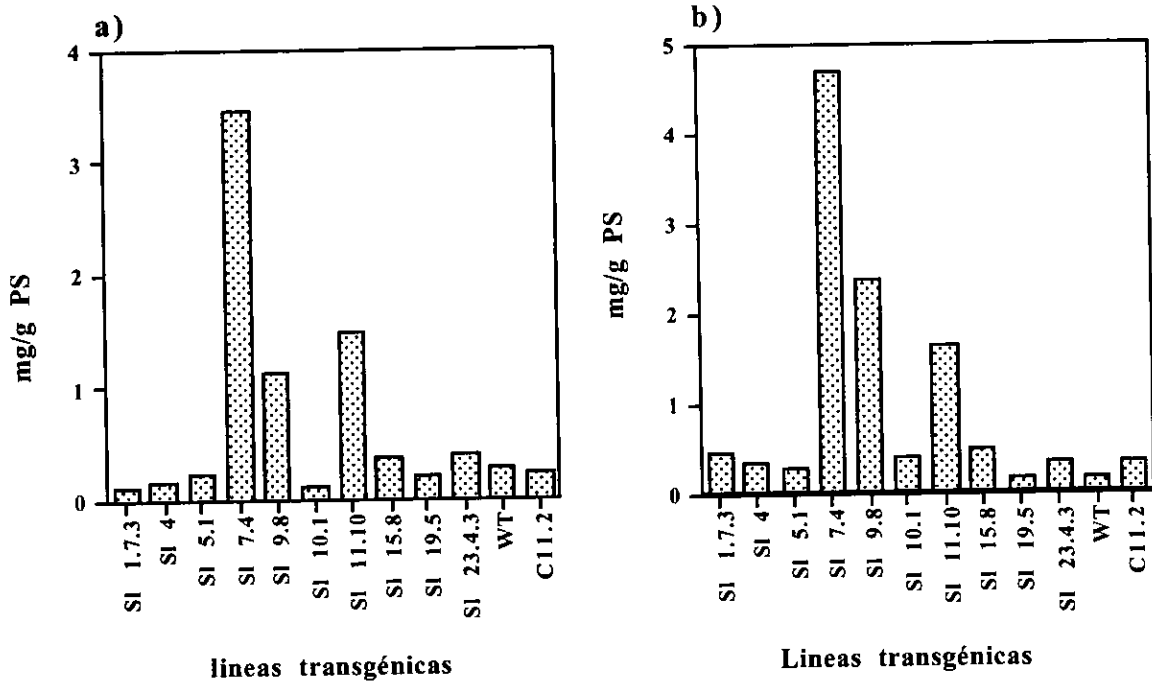


Figura 5.17 Cuantificación de trehalosa en líneas con el gene completo, a) en contacto con agua; b) en presencia de Validamicina A.

A diferencia de las líneas que llevan el gen completo, las líneas de la delección amino, exhibieron cantidades más bajas de trehalosa, 2 de las 5 líneas homocigas analizadas, alcanzaron cantidades de hasta 0.47 mg/g PS en ausencia del inhibidor (Figura 5.18 a), y en contacto con Validamicina (figura 5.18 b), alcanzaron niveles de hasta 2.63 mg/g PS, alrededor de 10 veces más que el control (vector solo) y WT, en las otras líneas los niveles de trehalosa alcanzados no son más que los controles, aunque si hay un aumento significativo en la cantidad de trehalosa, parte de esta variación podría ser explicada, probablemente, por el hecho de que la inhibición de la trehalasa depende de la toma del inhibidor Validamicina A, además de que solamente estuvo en contacto con este inhibidor 24 h y no parte de su desarrollo como en otros estudios (Goddjin, 1997). Esto explica también en parte que las cantidades de trehalosa obtenidas no sean mayores que las obtenidas cuando son sobreexpresados genes de la TPS1 de *E. coli* y levadura (Goddjin, 1997; Romero, 1997).

Contrariamente a los resultados esperados en relación al contenido de trehalosa, en los cuales se esperaba, mayor cantidad de trehalosa en líneas que llevan la delección que en líneas con el gene completo, una de las razones puede ser explicada por el hecho de que estudios anteriores en donde se observa este incremento se realizó en levadura (Mascorro, 2000) y tal vez en planta esta delección tenga otro efecto, además cabe mencionar que la selección de líneas T2 y T3 llevando la delección, fué difícil. Esto nos dá razón para especular, acerca de que esta delección si surte un efecto de incremento de trehalosa generando una toxicidad a la planta y por esto imposibles de seleccionar, y quizá tal vez por esto, las líneas que se pudieron seleccionar de esta delección, presentan menor contenido de trehalosa que las líneas con el gene completo.

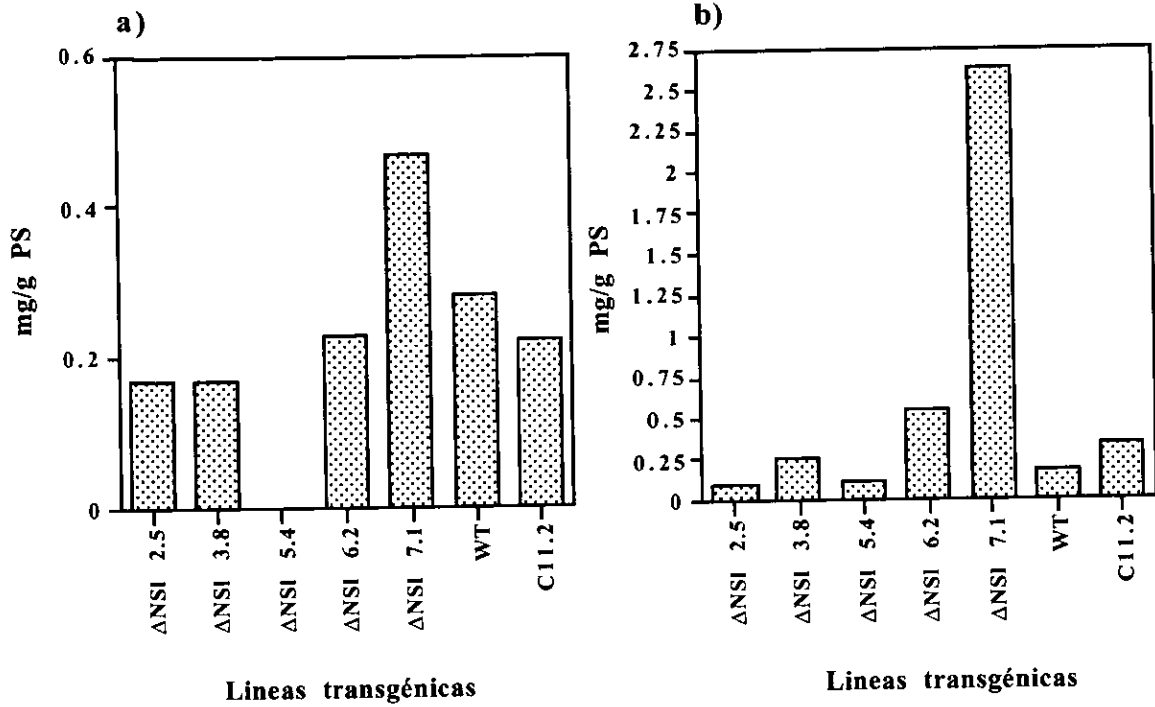


Figura 5.18 Cuantificación de trehalosa en líneas con el gene deletado a) en contacto con agua; b) en presencia de Validamicina A.

Por otra parte, para corroborar si efectivamente lo que se estaba cuantificando mediante HPLC, era trehalosa, se le adicionaron a las muestras que estuvieron en contacto con agua, la enzima trehalasa, para degradar la trehalosa. Como puede observarse en la figura 5.19, el pico de trehalosa en la línea SI 7.4 desaparece al adicionar la enzima trehalasa, comprobando de esta forma la veracidad de la determinación.

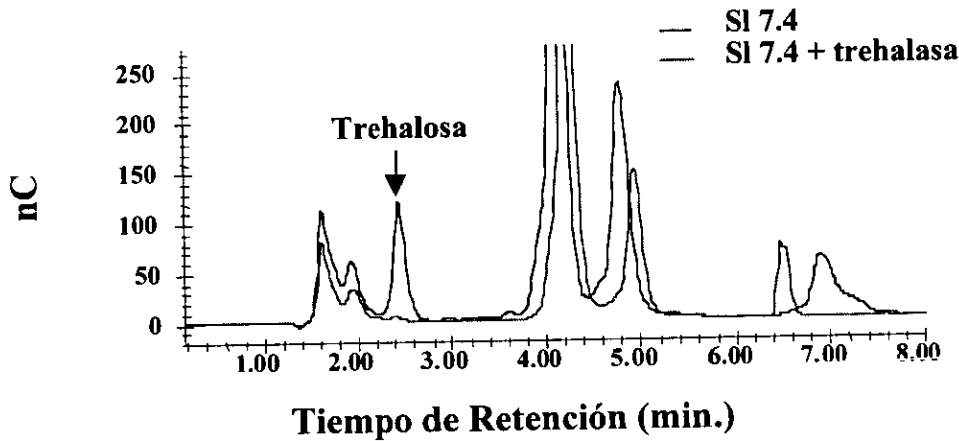


Figura 5.19 Análisis mediante HPLC de la inhibición de la trehalosa por medio de la enzima trehalasa.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

5.6 Efectos del estrés salino y osmótico

La figura 5.20 muestra los efectos del estrés salino sobre el crecimiento de plántulas después de la germinación. Las semillas de plantas silvestres, control y semillas de dos líneas T3 escogidas por su mayor contenido de trehalosa tanto para la construcción con el gene completo como para la delección, fueron germinadas sobre filtros de tela encima de MS solido, al cabo de dos semanas fueron transferidos por 24 hr estos filtros de tela a MS líquido suplementado con 200, 300 y 600 mM de NaCl y devueltos al medio de crecimiento por una semana más. No hubo diferencia en el crecimiento tanto de la silvestre, el control y de las líneas transgénicas a 600 mM de NaCl, todas dejaron de crecer después de esta semana y sus hojas se tornaron cloróticas, a 200 y 300 mM pareciera que tanto la silvestre como el control resisten más que las líneas transgénicas. Bajo condiciones control, en ausencia de NaCl, tanto las plantas silvestres como las transformadas, crecen adecuadamente. Estos resultados indican que las líneas transformadas, más que aumentar su tolerancia a estrés salino se vuelven más sensibles que la propia silvestres.

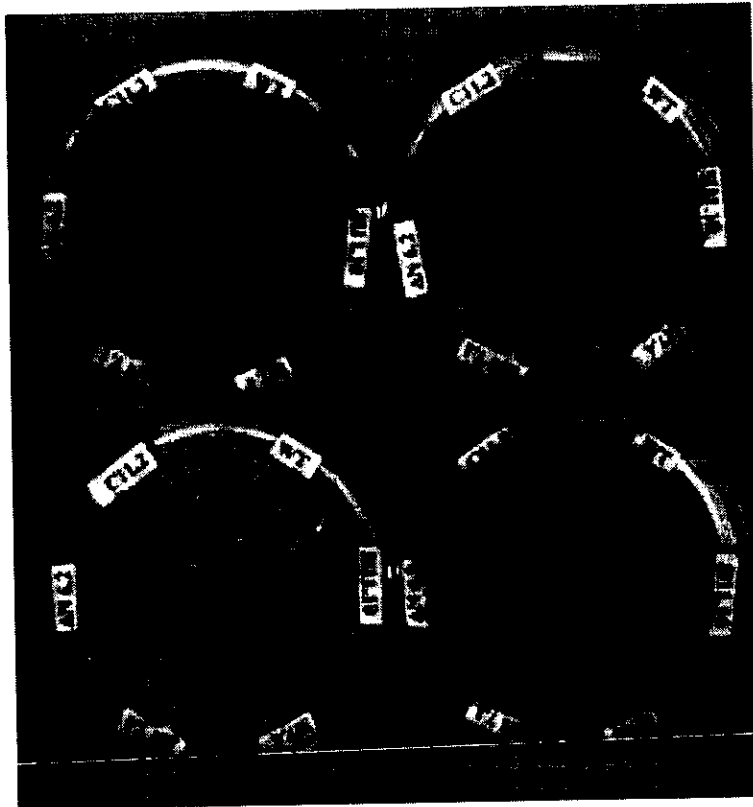


Figura 5.20 Efecto del NaCl sobre plántulas de líneas transgénicas. Las fotografías muestran a las plantas una semana después de crecimiento.

De igual forma que en el estrés salino, ocurrió en el caso del tratamiento con sorbitol, en las tres concentraciones utilizadas (0.5, 1.5 y 2 M) se observó un mejor crecimiento de la silvestre y control que las líneas sobreexpresoras. Aunque como puede observarse en la figura 5.21, la línea transgénica Δ NSI 6.2 resiste mejor el estrés osmótico, pareciera que la cantidad de trehalosa en esta línea le es suficiente, para tolerar el estrés, a diferencia de las otras líneas en las que el contenido de trehalosa es mayor y se ven más afectadas, esto puede ser posiblemente, a que de por si las plantas con elevada cantidad de trehalosa, se ven afectadas en su desarrollo, esto las hace más sensibles al estrés debido a su condición, en el caso particular de la línea antes mencionada su desarrollo no es afectado, por lo que pudiera tolerar un poco más el estrés.

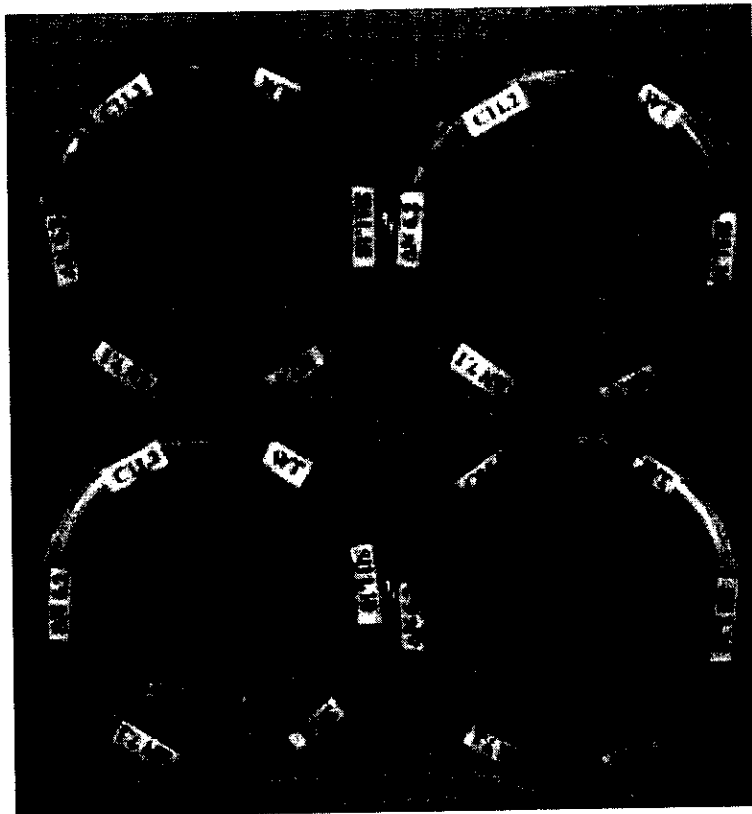


Figura 5.21 Efecto del sorbitol sobre plántulas de líneas transgénicas. Las fotografías muestran a las plantas una semana después de crecimiento.

5.7 Efectos a baja temperatura y choque térmico

Para examinar si en todo caso la introducción del gene *SITPSI* y su delección amino, así como la acumulación de trehalosa pueden aumentar la tolerancia al estrés por temperatura baja, plantas silvestres y transformadas fueron incubadas por 24 h a 4 ° C, bajo luz continua. Ninguna diferencia significativa entre las plantas silvestres y transformadas fueron detectadas al ser nuevamente incubadas por una semana a 24 ° C, solamente un retardo en el crecimiento (figura 5.22).

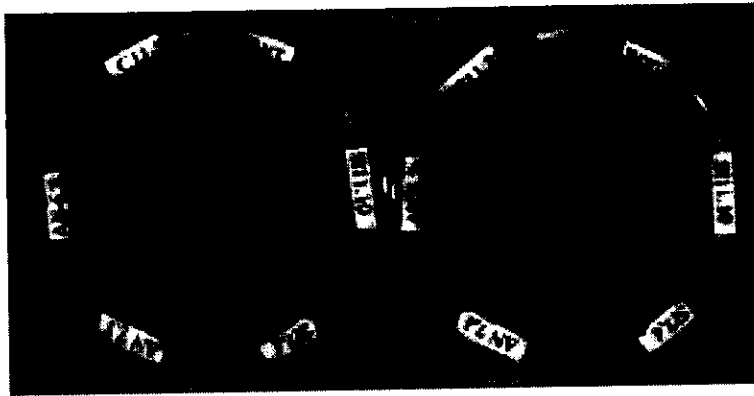


Figura 5.22 Efecto del frío sobre plántulas de líneas transgénicas. Las fotografías muestran a las plantas una semana después de crecimiento.

Por otro lado, plántulas T3 homocigas fueron crecidas durante dos semanas bajo las mismas condiciones que para el caso del tratamiento con NaCl y sorbitol. Una semana después del tratamiento, las plantas sobrevivientes fueron claramente identificadas por seguir creciendo, mientras que los efectos letales fueron identificados por la aparición de clorosis y cese de crecimiento.

En el experimento descrito en la figura 5.23, las plántulas control sobrevivieron hasta 46 ° C, mientras que los efectos letales fueron observados en las líneas transgénicas. De igual forma como ocurrió con el tratamiento con sorbitol, la línea Δ NSI 6.2 toleró de manera significativa el choque térmico hasta 48 ° C, aún en ausencia del pretratamiento a 34 ° C, (pretratamiento en el cual son inducidas las proteínas heat shock), a diferencia de las otras líneas transgénicas, las cuales no resistieron tan altas temperaturas. Correlacionando los resultados de los tratamientos de estrés y los experimentos de fenotipo, pareciera que en

esta línea (Δ NSI 6.2), la cantidad de trehalosa presente le es suficiente para tolerar el estrés osmótico y estrés por calor, y esta cantidad además no le causa un efecto tóxico para su desarrollo.

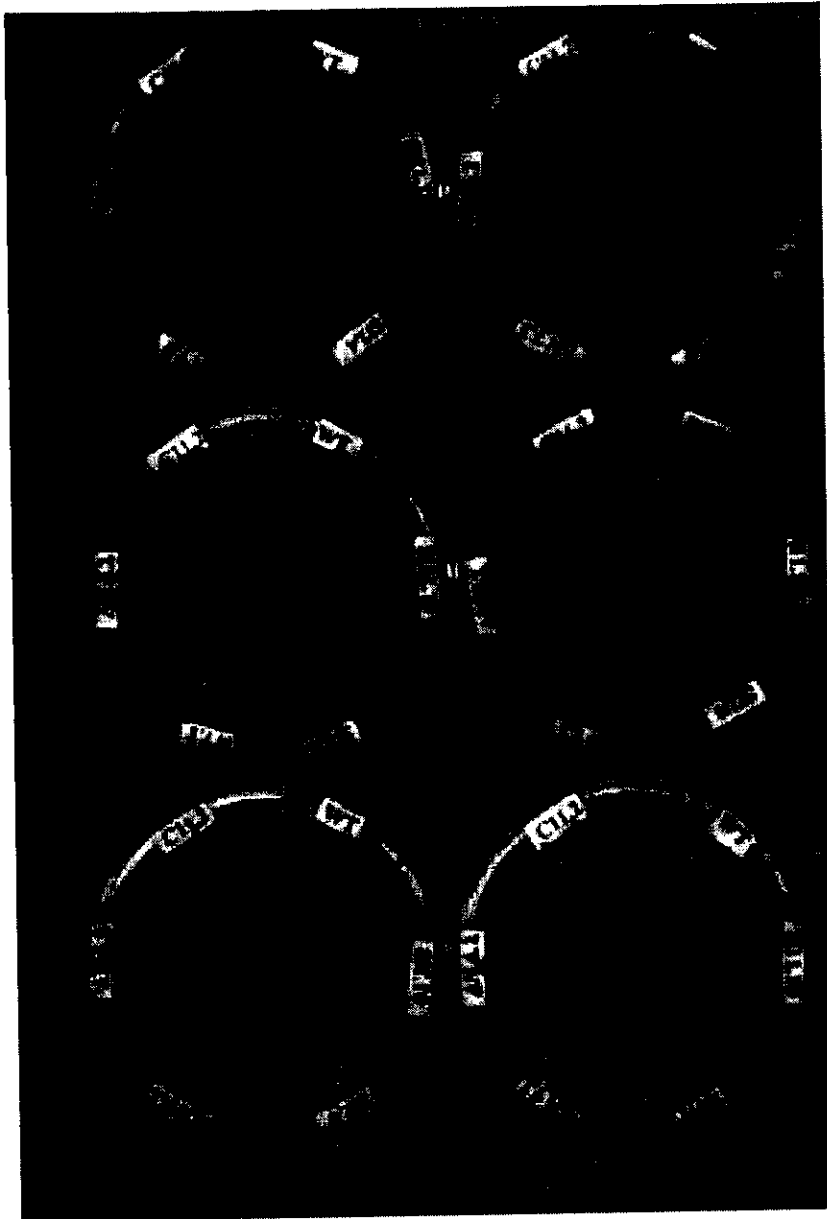


Figura 5.23 Efecto del choque térmico sobre plántulas transgénicas. Plántulas silvestres y transformadas con el gene *SITPS 1* sin pretratamiento (C) o después de una incubación a 34 ° C durante 1 h (34 ° C) fueron expuestas a un choque térmico durante 1 h a 42 ° C , 46 ° C, y 48 ° C. Las fotografías muestran a las plantas una semana después de crecimiento.

Capítulo VI

Conclusiones

- Se obtuvo una alteración en el desarrollo de las plantas transgénicas que sobreexpresan al gene SITPS 1, que van desde un retardo en el crecimiento, enanismo, esterilidad y formación de silicuas anormales.
- La cantidad máxima de trehalosa fué de 4.69 mg/g PS encontrada en la línea SI 7.4 la cual lleva al gene completo y de 2.63 mg/g PS en la línea Δ NSI 7.1 que lleva la delección en presencia de validamicina.
- No se obtuvo incremento en la cantidad de trehalosa en líneas transgénicas llevando la construcción con la delección amino-terminal, en comparación con líneas llevando la construcción con el gene completo.
- Las plantas transgénicas no mostraron tolerancia a estrés salino, osmótico, baja temperatura y choque térmico, en líneas con elevada cantidad de trehalosa.
- Se adquirió tolerancia significativa a 48°C en la línea Δ NSI 6.2, en la cual el contenido de trehalosa no es elevado, en comparación con las líneas que presentan un contenido mayor de este disacárido.

Capítulo VII

BIBLIOGRAFIA

- Abe, H; Yamaguchi-Shinozaki, K; Urao, T; Iwasaki, T; Osokawa, D; Shinozaki, K. Role of Arabidopsis MYC and MYB homologs in drought- and abscisic acid regulated gene expression. *Plant Cell.*, 1997, 9: 1859-1868
- Aisaka, K and Masuda, T. Production of trehalose phosphorylase by *Catellatospora ferruginea*. *FEMS Lett.*, 1995, 131: 47-51
- Allen, R. D. Dissection of oxidative stress tolerance using transgenic plants. *Plant Physiol.*, 1995, 107: 1049-1054
- Anselmino, O; Gilg, E. Trehalose in *Selaginella lepidophylla*. *Ber. Deut. Pharm. Ges.*, 1913, 23: 326-330
- Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 2000, 408:796-815
- Baker, J; Steele, C; Dure, L. III. Sequence and characterization of 6 Lea proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.*, 1988, 11:277-291
- Bartels, D; Schneider, K; Terstappen, G; Piatkowski, D; Salamini, F. Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Planta.*, 1990, 181: 27-34
- Bechtold, N; Ellis, J; Pelletier, G. *In Planta Agrobacterium* mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *CR Acad Sci Paris, Life Sciences.*, 1993, 316: 1194-1199
- Bent, A. F.; Kunkel, B. N.; Dahlbeck, D.; Brown, K. L.; Schmidt, R.; Giraudat, J.; Leung, J.; Staskawicz, B. J. RPS2 of *Arabidopsis thaliana*: a leucine rich repeat class of plant disease resistance genes. *Science.*, 1994, 265: 1856-1860

- Bhandal, I. S; Hauptmann, R. M; Widholm, J. M. Trehalose as cyoprotectant for the freeze preservation of carrot and tobacco cells. *Plant Physiol.*, **1985**, 78: 430-432
- Blazquez, M. A; Santos, E; Flores, C. L; Martinez-Zapater, J; Salinas, J; Gancedo, C. Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis TPS1* gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J.*, **1998**, 13: 685-690
- Bohnert, H. J; Nelson, D. E; Jensen, R. G. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell.*, **1995**, 7: 1099-1111
- Bray, E. A. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.*, **1993**, 103: 1035-1040
- Cabib, E. and Leloir, F. The biosynthesis of trehalose-6-phosphate. *J. Biol. Chem.*, **1958**, 231: 259-275
- Chang, S. S; Park, S. K; Nam, H. G. Transformation of *Arabidopsis* by *Agrobacterium* inoculation on wounds. *The Plant Journal.*, **1990**, 5(4): 551-558
- Clegg, J. S. The physical properties and metabolic status of *Artemia* cysts at low water content: The water replacement hypothesis. In *Membranes, metabolism and dry organisms*, Leopold A. C. (Ed.) Cornell Univ. Press, Ithaca, N. Y., **1985**, 169-187
- Clough, S and Bent, A. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal.*, **1998**, 16(6): 735-743
- Colaço, C; Sen, S; Thangavelu, M; Pinder, S; Roser, B. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: simplified molecular biology. *Biotechnology.*, **1992**, 10: 1007-1011
- Crowe, J. H; Hoekstra, F. A; Crowe, L. M. Anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.*, **1992**, 54: 579-599
- Crowe, J. H; Crowe, L. and Chapman, D. Preservation of membranes in anhydrobiotic organism: the role of trehalose. *Science*, **1984**, 223: 701-703

- Crowe, J. H; Carpenter, J. F. and Crowe, L. M. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.*, 1998, 60: 73-103
- Damm, B; Schmidt, R; Willmitzer, L. Efficient transformation of *Arabidopsis thaliana* using direct gene transfer to protoplast. *Mol. Gen. Genet.*, 1989, 213: 15-20
- Delauney, A. J. and Verna, D. P. S. Proline biosynthesis and osmoregulation in plants. *Plant J.*, 1993, 4: 215-223
- Drennan, P; Smith, M; Goldsworthy, D. and Van Staden, J. The occurrence of trehalose in the leaves of the desiccationtolerant angiosperm *Myrothamnus flabellifolius* Welw. *J. Plant Physiol.*, 1993, 142: 493-496
- Feldmann, K. A. and Marks, M. D. *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Mol. Gen. Genet.*, 1987, 208: 1-9
- Gadd, G; Chalmes, K. and Reed, R. The role of trehalose in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1987, 48: 249-254
- Gaff, D. Responses of desiccation tolerant resurrection plants to water stress. In Kreeb, K. H; Richter, H; Hinckley, T. M. (eds), *Structural and Functional Responses to Environmental Stresses: water shortage*. The Hague: SPB Academic Pub., The Netherlands., 1989, 255-268
- García, A; de Almeida Engler, J; Iyer, S; Gerats, T; van Montague, M; Caplan, A. Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. *Plant Physiol.*, 1997, 115: 159-169
- Goddijn, O. J. M. and Pen, J. Plants as bioreactors. *Trends Biotechnol.*, 1995, 13: 379-387
- Goddijn, O. J. M; Verwoerd, T. C; Voogd, E; Krutwagen, R; de Graaf, P; Poels, J; Van Dun, K; Ponstein, A. S; Damm, B; Pen, J. Inhibition of trehalase activity enhances trehalose accumulation in transgenic plants. *Plant Physiol.*, 1997, 113: 181-190

- Goddijn, O. J. M; Verwoerd, T. C; Voogd, E; Krutwagen, R; de Graaf, P; van Dun, K; De Laat, A; Van den Elzen, P; Damm, B; Pen, J Transgenic, tobacco plants as a model-system for the production of trehalose. *Plant Physiol.*, **1995**, 99: 1443-1448
- Gussin, A. and Mc Cormack, J. Trehalase and the enzymes of trehalose biosynthesis in *lillium longiflorum* pollen. *Phytochemistry.*, **1970**, 9: 1915-1920
- Gudman-Hoyer, E. *Am. J. Clin. Nutr.*, **1994**, 59 (suppl): 735S-741S
- Hollung, K; Espelund, M; Schou, K; Jakobsen, K. S. Developmental, stress and ABA modulation of mRNA levels for bZIP transcription factors and Vp1 in barley embryos and embryo-derived suspension cultures. *Plant Mol Biol*, **1997**, 35: 561-571
- Holmberg, N. and Bülow, L. Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Science*, **1998**, 3(2): 61-66
- Hölmstrom, K.-O; Mäntylä, E; Welin, B; Mandal, B; Palva, Tunnela, O; Londesborough, J. Drought tolerance in tobacco. *Nature.*, **1996**, 379: 683-684
- Hottiger, T; Boller, T. and Wiemken, A. Rapid changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **1987**, 255: 5518-5522
- Ineichen, K. and Wiemken, V. Changes in the fungus-specific, soluble-carbohydrate pool during rapid and synchronous ectomycorrhiza formation of *Picea abies* with *Pisolithus tinctorius*. *Mycorrhiza.*, **1992**, 2: 1-7
- Ingram, J. and Bartels, D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **1996**, 47: 377-403
- Iturriaga, G; Mascorro-Gallardo, J.O; Van Dijck, P; Van Vaeck, C; Thevelein, J. M. Specific genetic modification of the activity of trehalose-6-phosphate syntase and expression in a homologous or heterologous environment. Patente internacional solicitada en La Haya (No. 98203469.6-2106), **1998**
- Keen, N. and Williams, P. Translocation of sugars into infected cabbage tissues during clubroot development. *Plant Physiol.*, **1969**, 44: 748-754

- Keller, F; Schellenberg and Wiemken, A. Localization of trehalase in vacuoles and of trehalose in the cytosol of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). Arch. Microbiol., 1982, 131: 298-301
- Kidd, G. and Devorak, J. Biotechnology., 1994, 12: 1328-1329
- Kishor, P. B. K; Hong, Z; Miao, G; Hu, C. A; Verma, D. P. S. Overexpression of pyrroline-5-carboxylate synthase increases proline production and confers osmotolerance in transgenic plants. Plant Physiol., 1995, 108: 1387-1394
- Kono, Y; Takahashi, M; Matsushita, K; Nishina, M; Kameda, Y; Hori, E. Inhibition of flight in periplaneta americana (Linn.) by a trehalase inhibitor, validoxilamine A. J. Insect. physiol., 1994, 40: 455-461
- Koster, K. L. Glass formation and desiccation tolerance in seeds. Plant Physiol., 1991, 96: 302-304
- Leutwiler, L. S; Hough-Evans, B. R; Meyerowitz, E. M. The DNA of *Arabidopsis thaliana*. Mol. Gen. Genet., 1984, 194: 15-23
- Levitt, J. Responses of plants to enviromental stresses. Academic Press., 1972
- Lichtentaler, H. K. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. J. Plant Physiol., 1995, 148: 4-14
- Maréchal, L. and Belcopitow, E. Metabolism of trehalose in *Euglena gracilis*: I. Partial purification and some properties of trehalose phosphorylase. J. Biol. Chem., 1971, 247: 3223-3228
- Mascorro, O. Caracterización del gene *SITPS 1* de *Selaginella lepidophylla* por complementación funcional de *Sacharomyces cerevisiae*. Tesis de Maestría, Posgrado en Biotecnología, UACPyP-CCH, 2000, Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma de México.
- McCue, K. F. and Hanson, A. D. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. Trends Biotech., 1990, 8: 358-362

- Meinke, D. W; Cherry, J. M; Dean, C; Rounsley, S. D; Koornneef, M. *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science.*, **1998**, 282 (5389): 662-682
- Meyerowitz, E. M; Pruitt, R. E. *Arabidopsis thaliana* and plant molecular genetics. *Science.*, **1985**, 229: 1214-1218
- Meyerowitz, Elliot M. *Arabidopsis thaliana*. *Ann. Rev. Genet.*, **1987**, 21: 93-111
- Müller, J; Boller, T; Wiemken, A. Non-structural carbohydrate pools in soybean root nodules during water stress. *Physiol. Plant.*, **1996**, 98: 723-730
- Müller, J; Boller, T; Wiemken, A. Trehalose affects sucrose synthase and invertase activities in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) roots. *J. Plant Physiol.*, **1998**, 153: 255-257
- Müller, J; Boller, T; Wiemken, A. Trehalose metabolism in higher plants: recent developments. *Plant Science.*, **1995**, 112: 1-9
- Müller, J; Wiemken, A. and Aeschbacher, R. Trehalose metabolism in sugar sensing and plant development. *Plant Science.*, **1999**, 147: 37-47
- Müller, J; Xie, Z.-P; Staehelin, C; Mellor, R; Boller, T. and Wiemken, A. Trehalose and trehalase in root nodules of various legumes. *Physiol. Plant.*, **1994**, 90: 86-92
- Murashige, T.; Skoog, F. A revised Medium for Rapid Growth and BioAssays with tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum.*, **1962**, 15: 473-497
- Nakada, T. K; Maruta, K; Tsusaki, M; Kubota, H; Chaen, T; Sugimoto, M; Kurimoto and Tsujisaka, Y. Purification and properties of a novel enzyme, maltooligosyl trehalose synthase, from *Arthobacter sp.* Q36. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **1995**, 59: 2210-2214
- Nakagawa, H; Ohmiya, K; Hattori, T. A rice bZIP protein, designated OSBZ8, is rapidly induced by abscisic acid. *Plant J.*, **1996**, 9: 217-227
- Nielsen, E. T; Orcutt, D. M. *Physiology of Plants under stress. Abiotic Factors*

- Osmond, C. B; Austin, M. P; Berry, J. A; Billings, W. D; Boyer, J. S; Dacey, J. W. H; Nobel, P. S; Smith, S. D; Winner, W. E. Stress physiology and the distribution of plants. *Bioscience.*, 1987, 37: 38-48
- Phillips, D; Wilson, D; Dougherty, D. Soluble carbohydrates in legumes and nodulated nonlegumes. *J. Agric. Food Chem.*, 1984, 32: 1284-1291
- Pruitt, R. E; Meyerowitz, E. M. Characterization of the genome of *Arabidopsis thaliana*. *J. Mol. Biol.*, 1986, 187: 169-183
- Roitsch, T. Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology.*, 1999, 2: 198-206
- Romero, C; Bellés, J. M; Vayá, J. L; Serrano, R; Culiañez-Maciá, F. A. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthase gene in transgenic tobacco plants: pleiotropic phenotypes include drought tolerance. *Planta.*, 1997, 201: 293-297
- Roser, B. Trehalose: a new approach to premium dried foods. *Trends in Food Science & Technology.*, 1991, 2: 166-169
- Roser, B. and Çolaco, C. A sweeter way to fresher food. *New Scientist.*, 1993, 138: 24-27
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. *Molecular cloning: A Laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory press., 1989. Second edition.
- Schellenbaum, L; Müller, J; Boller, T; Wiemken, A; Schüepp, H. Effects of drought on non-mycorrhizal and mycorrhizal maize: Changes in the pools of non-structural carbohydrates, in the activities of invertase and trehalase, and in the pools of amino acids and imino acids. *New Phytol.*, 1998, 138: 59-66
- Schubert, A; Wyss, P; Wiemken, A. Occurrence of trehalose in vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and in mycorrhizal roots. *J. Plant Physiol.*, 1992, 140: 41-45
- Shachar-Hill, Y; Pfeffer, D; Douds, D; Osman, L; Doner, R; Ratcliffe, R. Partitioning of intermediary carbon metabolism in vesicular-arbuscular mycorrhizal leek. *Plant Physiol.*, 1995, 108: 7-15

- Shinozaki, K; Yamaguchi-Shinozaki, K. Molecular responses to drought and cold stress. *Curr Opin Biotechnol.*, 1996, 7: 161-167
- Smirnoff, N. The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytol.*, 1993, 125: 27-58
- Tarczynski, M. C; Jensen, R. G; Bohnert, H. J. Stress protection of transgenic tobacco by production of the osmolyte mannitol. *Science.*, 1993, 259:508-510
- The *Arabidopsis* Information Resource, TAIR. <http://www.arabidopsis.org/>, 2000
- Thevelein, J. M and Hohmann, S. Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast?. *TIBS.*, 1995, 20: 3-10
- Valvekens, D; Van Montagu, M; Van Lijsebettens, M. *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* root explants by using kanamycin selection. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1988, 85: 5536-5540
- Veluthambi, K; Mahadevan, S; Maheshwari, R. trehalose toxicity in *Cuscuta reflexa*. *Plant Physiol.*, 1981, 68: 1369-1374
- Voguel, G; Aeschbacher, R. A; Müller, J; Boller, T; Wiemken, A. Trehalose-6-phosphate phosphatases from *Arabidopsis thaliana* : identification by functional complementation of the yeast tps2 mutant. *Plant J.*, 1998, 13: 673-683
- Weisburd, S. Death-defying dehydration. *Science.*, 1988, 133: 107-110
- Wiemken, A. Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate.- *Ant. van Leeuwenhoek J. Gen. Microbiol.*, 1990, 58: 209-217
- Yancey, P. H; Clark, M. E; Hand, S. C; Bowlus, P. D; Somero, G. N. Living with water stress- evolution of osmolyte systems. *Science.*, 1982, 217: 1214-1217
- Zentella, R; Mascorro-Gallardo, J. O; Van Dijck, P; Folch-Mallol, J; Bonini, B; Van Vaeck, Ch; Gaxiola, R; Covarrubias, A. A; Nieto-Sotelo, J; Thevelein, J. M. and Iturriaga, G. A *Selaginella lepidophylla* trehalose-6-phosphate synthase complements growth and stress tolerance defects in a yeast tps 1 mutant. *Plant Physiol.*, 1999, 119: 1473-1487