



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**ANÁLISIS COMPARATIVO DEL PERFIL GLOBAL DE DEHIDRINAS EN
PLANTAS DE MAÍZ CON RESPUESTA A ESTRÉS A HÍDRICO**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

ALEJANDRA KAREN HERNÁNDEZ GUILLÉN



MÉXICO, D.F.

AÑO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** ESTELA SÁNCHEZ QUINTANAR

VOCAL: **Profesor:** SOBEIDA SÁNCHEZ NIETO

SECRETARIO: **Profesor:** FRANCISO JAVIER PLASENCIA DE LA PARRA

1er. SUPLENTE: **Profesor:** PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMÉNEZ

2° SUPLENTE: **Profesor:** AURORA LARA NUÑEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 103, EDIFICIO DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

DRA. ESTELA SÁNCHEZ QUINTANAR

SUSTENTANTE:

ALEJANDRA KAREN HERNÁNDEZ GUILLÉN

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	Generalidades del maíz.....	1
1.2	Importancia mundial del maíz.....	1
1.3	El maíz en México.....	2
1.4	Características del maíz.....	2
1.5	Condiciones para el cultivo de maíz.....	3
1.6	Etapas de crecimiento.....	4
1.7	Razas de maíz.....	5
1.8	Tuxpeño.....	5
1.9	El maíz y el cambio climático.....	7
1.10	Líneas de maíz.....	7
2	ANTECEDENTES.....	8
2.1	Dehidrinas.....	9
2.2	Clasificación de las dehidrinas.....	11
2.3	Localización.....	12
2.4	Funciones.....	12
2.5	Organismos Transgénicos.....	13
3	JUSTIFICACIÓN.....	16
4	HIPÓTESIS.....	17
5	OBJETIVOS.....	17
5.1	General.....	17

5.2	Particulares.....	17
6	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	18
7	MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
7.1	Estandarización del anticuerpo antisegmento-K de dehidrinas.....	19
7.2	Perfil de dehidrinas en semillas de maíz durante la imbibición.....	20
7.3	Detección de dehidrinas en plantas de maíz sometidas a estrés por sequía.....	20
7.4	Cuantificación de contenido relativo de agua.....	22
8	RESULTADOS.....	23
8.1	Detección de dehidrinas en semilla.....	23
8.2	Detección de dehidrinas en plantas de maíz sometidas a estrés por sequía.....	26
8.3	Contenido relativo de agua y sobrevivencia de las plantas sometidas a estrés hídrico.....	28
8.4	Perfil global de dehidrinas en la parte aérea en las plantas de maíz.....	29
8.5	Perfil global de dehidrinas en la raíz de las plantas de maíz.....	31
8.6	Resumen.....	34
9	DISCUSIÓN.....	35
10	CONCLUSIONES.....	41
11	PERSPECTIVAS.....	42
12	BIBLIOGRAFÍA.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Principales países productores de maíz.....	1
Figura 2.	Superficie cosechada de maíz por cultivo regado y por temporal en México	2
Figura 3.	Relación entre requerimiento hídrico y etapa de desarrollo de la planta de maíz.....	3
Figura 4.	Etapas de desarrollo del maíz	4
Figura 5.	Distribución de la raza maíz Tuxpeño en México.....	6
Figura 6.	Segmentos presentes en las Dehidrinas LEA 2 y los aminoácidos consenso de cada uno de los segmentos.....	10
Figura 7.	Clasificación de las dehidrinas respecto a los segmentos presentes	11
Figura 8.	Modelos propuestos de acción.....	13
Figura 9.	Efecto del estrés osmótico en plantas transgénicas.....	14
Figura 10.	Expresión de tres genes LEA de maíz en <i>E. coli</i>	16
Figura 11.	Estandarización del anticuerpo antisegmento-K en proteínas de ejes de semilla de maíz quiescente Tuxpeño.	24
Figura 12.	Perfil de dehidrinas en semillas de maíz Tuxpeño durante la imbibición.....	25
Figura 13.	Comparación del perfil de dehidrinas presentes en el eje de semilla de maíz quiescente de la raza Tuxpeño (Tux), línea tolerante (L.14) y línea sensible (L.13).....	26
Figura 14.	Plantas de maíz sometidas a estrés por sequía.....	28
Figura 15.	Porcentaje de contenido relativo de agua en plántulas de maíz sometidas estrés con PEG 8000.....	29
Figura 16.	Porcentaje de plantas supervivientes ante el estrés con PEG 8000.....	30
Figura 17.	Identificación de dehidrinas en la parte aérea de plántulas de maíz de la raza Tuxpeño sometidas estrés por sequía..	31
Figura 18.	Identificación de dehidrinas en la parte aérea de plántulas	

de maíz de la línea tolerante sometidas estrés por sequía. 31

Figura 19. Identificación de dehidrinas en la parte aérea de plántulas de maíz de la línea sensible sometidas estrés por sequía.. 32

Figura 20. Perfil de dehidrinas de la raíz de plántulas de maíz sometidas estrés por sequía..... 34

Figura 21. Western Blot antisegmento-K de la parte aérea y la raíz de plántulas de maíz de la raza Tuxpeño normal y la línea tolerante sometidas estrés por sequía..... 35

Tabla 1. Proteínas identificadas por Espectrometría de Masas..... 36

Abreviaturas

- ✚ **aa:** Aminoácidos
- ✚ **ABA:** Ácido abscísico
- ✚ **ABRE:** Elementos de respuesta a ABA
- ✚ **APS:** Persulfato de amonio
- ✚ **CHAPS:** 3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato
- ✚ **CRA:** Contenido relativo de agua
- ✚ **Da:** Daltones
- ✚ **DHN:** Dehidrina (Dehydrin)
- ✚ **DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- ✚ **DTT:** Ditiotreitól
- ✚ **EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético
- ✚ **IDP:** Proteína intrínsecamente desordena
- ✚ **IEF:** Isoelectroenfoque
- ✚ **IUP:** Proteína intrínsecamente desestructuradas
- ✚ **LEA:** Proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (Late embryogenesis abundant protein)
- ✚ **PFAM:** Familia de proteínas (Protein Family)
- ✚ **PMSF:** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- ✚ **PVDF:** Polifluoruro de vinilideno
- ✚ **TBS:** Solución amortiguadora salina con Tris
- ✚ **PEG:** Polietilenglicol
- ✚ **pH:** Potencial de hidrogeno
- ✚ **ppm:** Partes por millón
- ✚ **RAB:** De respuesta a ABA (responsive to ABA)
- ✚ **RNA:** Ácido ribonucleico
- ✚ **ROS:** Especies reactivas de oxígeno (Reactive oxygen species)
- ✚ **SDS:** Dodecil sulfato de sodio
- ✚ **SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
- ✚ **TCA:** Ácido tricloacético
- ✚ **TEMED:** N,N,N, N',- tetrametil etilendiamina
- ✚ **WB:** Western Blot

Resumen

Las dehidrinas (DHN) son proteínas que pertenecen a la familia de las LEA del inglés late embryogenesis abundant (abundantes en la embriogénesis tardía). La primera vez que se describieron fue hace 30 años como proteínas acumuladas en las semillas de algodón. Después se encontraron en tejidos vegetativos en condiciones de estrés abiótico y actualmente se sabe que también se encuentran en algunos organismos invertebrados.

Las dehidrinas pueden contener tres segmentos: el K, el Y y el S. El segmento K es el único presente en todas las DHN y es considerado esencial para su funcionamiento, ya que puede formar una estructura anfipática α -helice, la cual se ha sugerido que interacciona con las membranas celulares para darle a esta última mayor estabilidad en condiciones de estrés.

En general, se considera que las dehidrinas tienen la capacidad de proteger a las células ante diversos daños causados por diferentes tipos de estrés como: sequía, calor, salinidad, congelamiento, entre otros. Por esta capacidad protectora, las DHN pueden ser utilizadas en granos de alto consumo e importancia a nivel mundial como es el maíz, ya que su sensibilidad a los cambios climáticos afecta la cosecha tanto en cantidad como en calidad. Por tal motivo, en este trabajo se analizó la presencia de dehidrinas en tres variedades de maíz con el fin de correlacionar la presencia de estas proteínas en plantas de maíz con diferente tolerancia a la sequía.

Las tres variedades estudiadas fueron: una tolerante a la sequía (L14) obtenida por selección recurrente, una sensible a la sequía (L13) y una raza "silvestre" (Tuxpeño) que se desarrolla en climas cálidos.

Los resultados obtenidos demuestran que la planta tolerante (L14) es la más resistente al tratamiento con PEG-8000 con el que se simuló condiciones de sequía. Además este genotipo presentó una dehidrina en particular, identificada como la RAB17, de forma anticipada y en mayor concentración. Estos datos sugieren que parte de la tolerancia que presenta la variedad L14 es gracias a la RAB17.

Introducción

GENERALIDADES DEL MAÍZ

El maíz es uno de los cereales más importantes a nivel mundial, por sus amplios y múltiples usos y de los de mayor producción junto con el arroz y el trigo. En el 2013, este cereal alcanzó a nivel mundial una producción de 1,018,111,958 toneladas (FAOSTAT, 2013). Entre los principales productores se encuentran Estados Unidos de América, China y Brasil (Figura 1). México se encuentra en el séptimo lugar con 22 millones de toneladas (FAOSTAT, 2013).

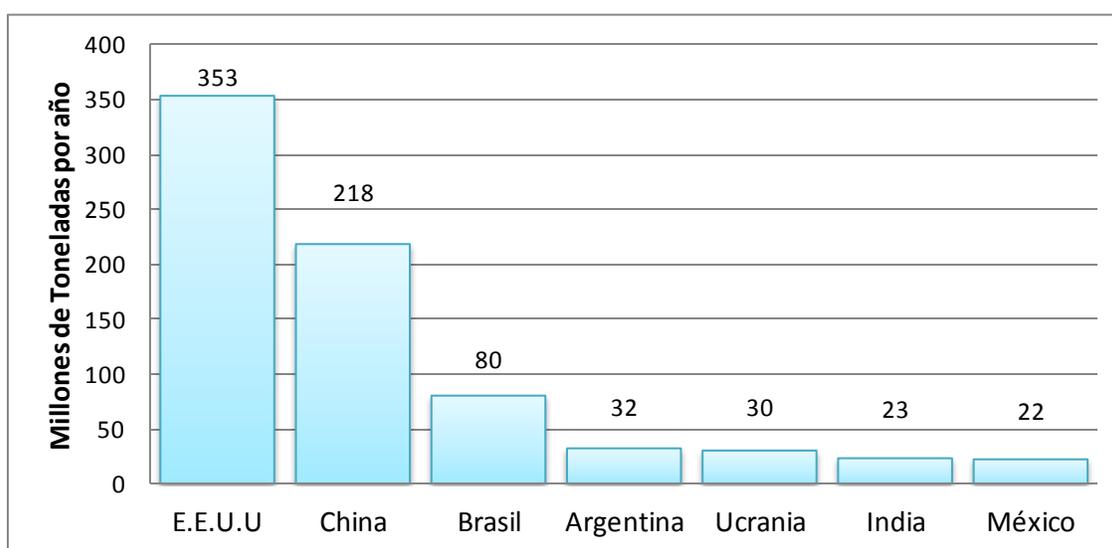


Figura 1. Principales países productores de maíz (FAOSTAT, 2013).

USOS DEL MAÍZ

El maíz tiene una gran importancia a nivel mundial, principalmente por su uso para consumo humano. Del maíz se obtiene una gran variedad de productos, que van desde los menos procesados, como es la harina y el aceite de maíz, hasta algunos jarabes como son la dextrosa y alta fructosa, los cuales son usados como materia prima para producir alimentos de mayor complejidad, tales como panes, papas, pasteles, pastas, entre otros. Actualmente, la dextrosa y el jarabe de alta fructosa son ampliamente usados como sustitutos del azúcar para endulzar bebidas y otros alimentos procesados, ya que su rendimiento es mayor al del azúcar. En los Estados Unidos de América se encuentran más de 1,000 productos alimenticios derivados total o parcialmente del maíz (Dowswell *et al.*, 1996). Además, el maíz

también es usado como forraje para el ganado y otros animales de producción como los cerdos. Recientemente, en algunos países el maíz es usado para producir biocombustible y etanol. Lo cual ha aumentado la demanda de esta planta.

EL MAÍZ EN MÉXICO

El maíz es por mucho el cultivo agrícola más importante de México, no solo por los usos antes mencionados, sino porque el maíz es la base de la dieta del mexicano, ya que desde tiempos ancestrales se ha usado ampliamente en platillos tradicionales, sin mencionar el uso de la tortilla.

Los agricultores mexicanos siembran maíz en aproximadamente la mitad del total de la superficie destinada a los demás cultivos, es decir, alrededor de 9.6 millones de hectáreas están destinadas a la producción de maíz, con un promedio de rendimiento de 2.2 ton/ha (FAOSTAT, 2013). El uso de variedades mejoradas es de solo 20 % de la producción de maíz y el 85 % del maíz cultivado es de siembra de temporal (Figura 2).

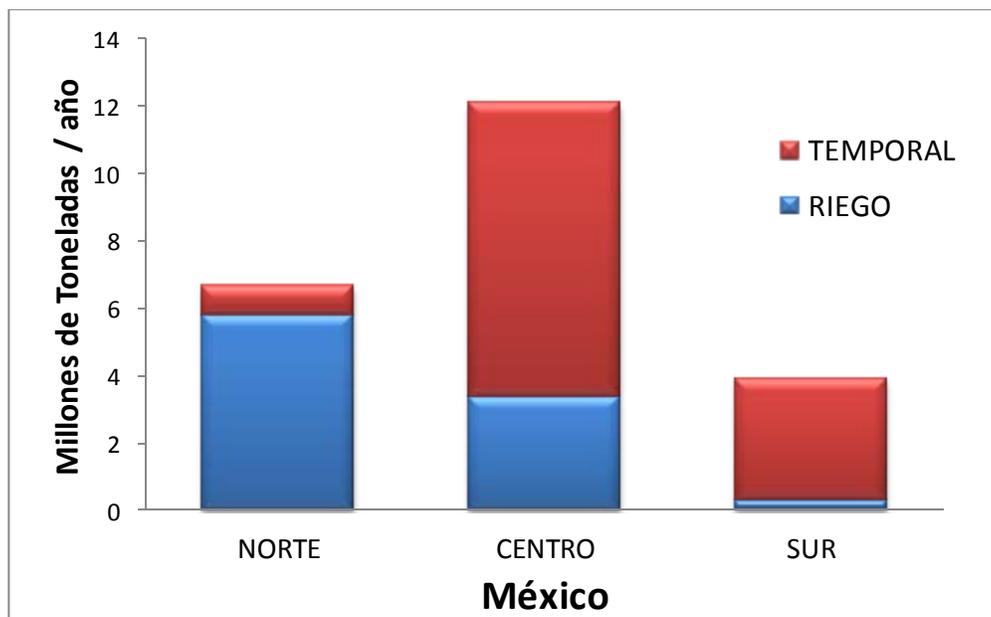


Figura 2. Producción de maíz por cultivo regado y por temporal en México (Siap, 2013).

CARACTERÍSTICAS DEL MAÍZ

El maíz pertenece a la familia de las Gramíneas, es de origen Mesoamericano y está relacionado con el teocintle. La planta del maíz es anual, de inflorescencia monoica y puede medir entre 2 y 6 m dependiendo de la variedad (Wellhausen *et al.* 1951). En esta especie, la

posición del aparato masculino y femenino favorece la polinización cruzada, lo que da como resultado una mazorca. La mazorca es la estructura donde se desarrolla el grano, con un número variable de hileras que va de 8 a 16, produciendo de 300 a 1000 granos, dependiendo de la variedad (Wellhausen *et al.* 1951, FAOSTAT, 2012).

CONDICIONES PARA EL CULTIVO DE MAÍZ

El maíz se siembra en una gran variedad de regiones que van desde altitudes de 0 msnm (a nivel del mar) a 4000 msnm y suelos y climas muy variables. Sin embargo para su óptimo crecimiento el maíz necesita temperaturas entre 25 y 30°C. En cuanto a las condiciones hídricas, el maíz se siembra desde regiones de precipitación pluvial de menos de 400 mm hasta 3000 mm (Roberts *et al.*, 1957; Ortega-Paczka *et al.*, 2003). Sin embargo, la planta de maíz puede necesitar diferente volumen de riego de precipitación de acuerdo a la etapa de desarrollo en la que se encuentre. Por ejemplo, la etapa de floración es la más demandante de agua, ya que de este periodo dependerá la calidad y cantidad de la cosecha obtenida (Reyes, 1990). La figura 3 presenta una escala de requerimiento hídrico de acuerdo a su etapa de crecimiento.

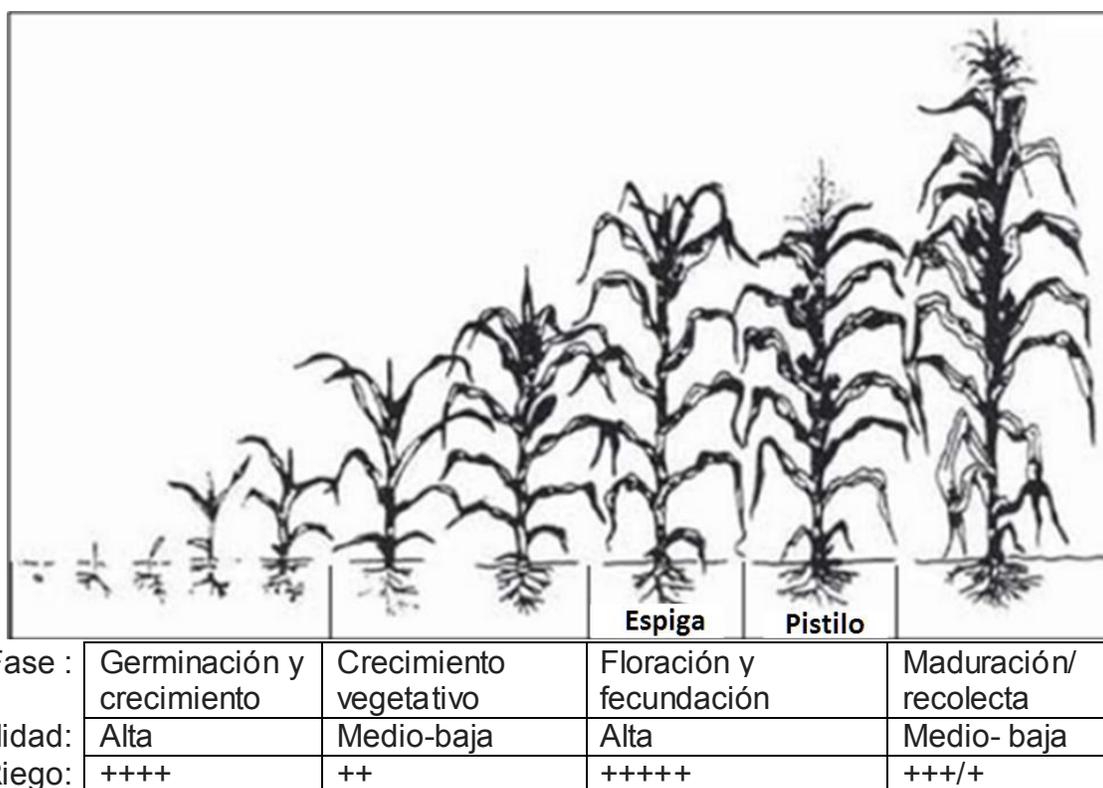


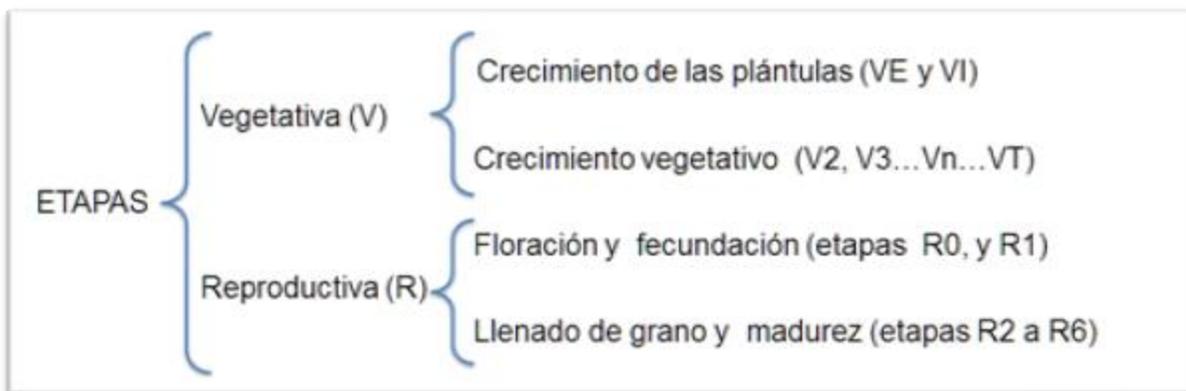
Figura 3. Relación entre la fase del desarrollo, la sensibilidad a estrés hídrico y el requerimiento de riego en la planta de maíz (FAO, 2013).

ETAPAS DE CRECIMIENTO

Con el fin de homogeneizar las etapas de crecimiento en los estudios del maíz, los investigadores han normalizado las definiciones de dichas etapas, de esta forma se puede comparar la fenología del maíz bajo diferentes condiciones ambientales y tratamientos experimentales.

Las etapas de crecimiento se dividen en las siguientes categorías (Figura 4):

La etapa vegetativa se divide en dos: el crecimiento de las plántulas, que empieza desde que el coleoptilo emerge de la superficie del suelo (VE) y continua hasta que es visible el nodo de la primera hoja (V1); y el crecimiento de la planta, que prosigue con la visibilidad de cada una de las hojas siguientes (V2...VN) y termina una vez que se observa completamente la panícula o espiga (VT) (Ritchie, 1992).



Figura

4. Etapas de desarrollo del maíz (Ritchie, 1992).

La etapa reproductiva también se divide en dos, en la floración y fecundación, y el llenado de grano. La etapa de floración y fecundación empieza una vez que es completamente visible la rama de la panícula/espiga (masculino) y se empiezan a observar los pistilos o los comúnmente llamados pelos (R1). En la etapa R2 los pelos o sedas que ya han sido fecundados se tornan de un color café, así mismo en esta etapa comienza en la semilla la formación de la radícula, el coleoptilo y la primera hoja embrionaria. Esta etapa dura desde la primera semana de la polinización, hasta los 18 días. La etapa R3 va de los 18 a los 22 días, en esta etapa empieza el “llenado de grano” es decir, se empieza a acumular el almidón y las otras reservas. Después, en la etapa R4 la consistencia del almidón se vuelve pastosa y el

grano sigue creciendo. En la etapa R5 empieza el proceso de desecación del grano. Finalmente, en la etapa R6, los granos alcanzan el estado de mayor madurez y desecación (Ritchie, 1992).

RAZAS DE MAÍZ

El término raza se utiliza para agrupar individuos o poblaciones que comparten características en común, de orden morfológico, ecológico, genético y de historia de cultivo (Anderson y Cutler, 1942)

Actualmente se considera que existen en el continente americano entre 220 y 300 razas de maíz (Brown y Goodman, 1977; Vigouroux *et al.*, 2008). A través del tiempo se han utilizados diversos métodos para caracterizarlas, desde los caracteres visuales hasta marcadores isoenzimáticos y taxonomía numérica.

En México, el maíz posee una gran gama de variación debido principalmente a su polinización libre y a su alta adaptabilidad. Por tal razón, ha sido necesaria su clasificación continua. Según diferentes autores e instituciones existen entre 41 (Ortega *et al.*, 1991), 59 (Sánchez *et al.*, 2000) o 65 (Eberhart *et al.*, 1991) razas. Cada una con características específicas adquiridas de acuerdo al ambiente donde se ha desarrollado. En esta investigación se usará maíz de la raza Tuxpeño, por sus características y adaptabilidad al medio ambiente. Las más importantes serán mencionadas a continuación.

TUXPEÑO

La raza Tuxpeño, se le denomina así por la Ciudad de Tuxpan, Veracruz, lugar donde se encontraron poblaciones típicas de la raza en las primeras colecciones de maíz en México (Wellhausen *et al.* 1951).

Esta raza es de los materiales más productivos de las áreas tropicales, tiene porte alto de planta y llega a medir hasta 3 m. La mazorca es larga, medianamente delgada, cilíndrica y con un número de hileras de 12 a 16. De granos anchos y ligeramente gruesos.

El potencial de cultivo del maíz Tuxpeño es muy amplio, ya que puede adaptarse perfectamente bien en todos los ambientes tropicales. Sin embargo, como se muestra en la

figura 5, presenta mayor concentración hacia la vertiente del Golfo de México (CONABIO, 2011). Actualmente, su distribución y frecuencia han aumentado (Perales y Golicher, 2014).

El maíz Tuxpeño es una de las razas más importantes por sus características genéticas y fisiológicas. Además, su germoplasma ha sido usado para mejoramiento y ha figurado entre los antecesores de algunas de las razas, e híbridos más productivos y agrónomicamente satisfactorios, tanto de México como de los EE.UU (Wellhausen *et al.*, 1951; CONABIO, 2011).

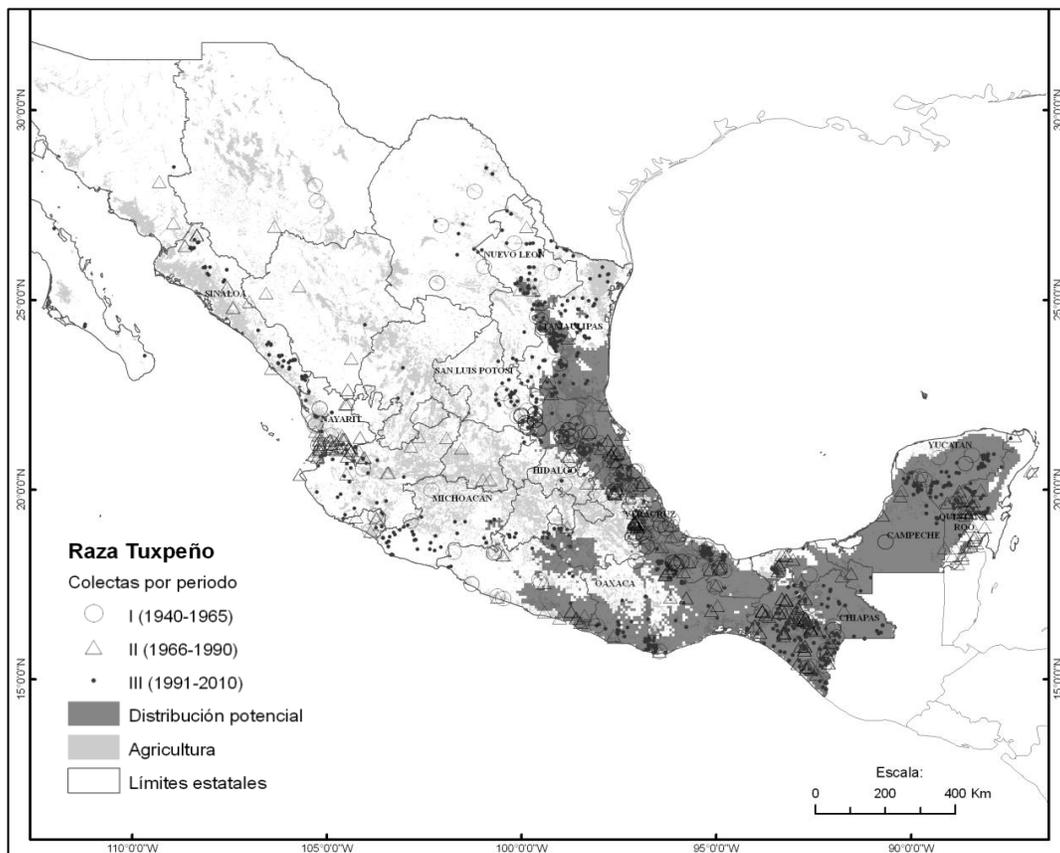


Figura 5. Distribución de la raza maíz Tuxpeño en México. Mapa obtenido del Proyecto Global de Maíces Nativos. CONABIO, 2011

EL MAÍZ Y EL CAMBIO CLIMÁTICO

El estrés abiótico es uno de los factores más limitantes en el crecimiento de las plantas y en la producción de alimentos en muchas regiones del mundo. Entre estos factores, la sequía es el agente más perjudicial en la agricultura a nivel mundial, además de que favorece la

desertificación y la salinización de los suelos (Vinocur y Altaman, 2005, Ribaut *et al.*, 2007), lo que afecta los rendimientos de los cultivos.

En el caso del cultivo de maíz se estima que, actualmente, los factores antes mencionados afectan una quinta parte de las áreas designadas a su producción y se espera que aumente hasta el 50 % para el año 2050, debido al cambio climático (Vinocur y Altaman, 2005).

En los modelos de Bellon (Bellon *et al.*, 2011), donde se evalúa la vulnerabilidad del maíz respecto al cambio climático, se predice disminución de lluvias, lo que causará aumento de temperaturas y sequía en las regiones del cultivo de maíz. Como consecuencia, el área de condiciones óptimas disponible para la producción de maíz muy probablemente disminuirá.

El maíz cultivado en México presenta gran diversidad y adaptabilidad, ya que como se mencionó antes, es capaz de crecer en diferentes ambientes, que van desde áridos a húmedos y de altas temperaturas hasta templadas. Sin embargo, los cambios esperados pueden ser peores de lo que se estima, lo cual, pondría a prueba la adaptabilidad y supervivencia del maíz (Bellon *et al.*, 2011).

Líneas de maíz

Las líneas de maíz se obtienen por mejoramiento genético y selección recurrente en el campo después de varios años, esto es el procedimiento de selección y es repetido consecutivamente hasta llegar a los niveles de mejoramiento esperados. Por medio de la selección recurrente se mejoran las poblaciones de maíz en forma gradual y continúa, y se descartan las fracciones con las características no deseadas en cada ciclo. Las plantas con las mejores características se cruzan entre ellas para producir una nueva generación para el ciclo siguiente de selección. El proceso de cruzamiento tiene una importancia fundamental porque gradualmente incrementa la frecuencia de los genes deseables y de las combinaciones de genes. Esto mejora el comportamiento de la población para las características sobre las que se pone presión de selección (Hallauer y Miranda, 1981; Hallauer *et al.*, 1985; 1992)

Por todas las razones antes mencionadas es necesario el desarrollo de investigaciones de variedades de maíz tolerantes a sequía de preferencia por ingeniería genética y cultivo *in vitro*, ya que los métodos convencionales requieren más tiempo y área de cultivo. Así, se podría contribuir a cubrir la alta demanda de maíz para consumo humano, pecuario e industrial, aún en condiciones ambientales adversas.

En este trabajo se utilizaron dos líneas de maíz obtenidas a partir de más de 50 variedades de diferentes razas en el Programa de Genética, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. La línea 14 (L14) y la línea 13 (L13) tienen buen rendimiento en condiciones óptimas. Sin embargo, en condiciones de sequía la L14 reduce su rendimiento en un 20 % y la otra hasta en un 71 %, por lo que la primera se considera tolerante y la otra sensible a dicho factor (Zarco-Perelló *et al.*, 2005). Para establecer un caso contrastante, se estudió la raza Tuxpeño, la cual, fue considerada como “normal” ya que no ha pasado por un proceso de selección recurrente para la característica que siguieron las otras líneas que se investigaron como las líneas tolerante y sensible (L14 y L13).

Antecedentes

Las plantas, en el medio ambiente, están expuestas a constantes cambios climáticos, como sequía extrema, salinidad, entre otras, por lo que han tenido que desarrollar sistemas que permitan su adaptación y supervivencia en condiciones desfavorables (Leprince y Buitink, 2010).

La adaptación de las plantas al estrés está controlada por cascadas de señalización. Esto activa los mecanismos de respuesta al estrés, ya sean morfológicos, bioquímicos o fisiológicos, con el fin de restablecer la homeostasis celular, así como reparar y proteger los componentes celulares (Ashraf, 1994; Wang *et al.*, 2003; Shulaev *et al.*, 2008).

Genéticamente, la respuesta al estrés es poligénica, es decir, varios genes participan en las vías de señalización, además de los que codifican para proteínas que confieren tolerancia a dicho estrés. Entre estas proteínas, que actúan en respuesta al estrés abiótico, se encuentran las dehidrinas, junto con muchas otras como son las chaperonas, las HSPs y otros grupos de

la familia de las proteínas LEA (Ozturk *et al.*, 2002; Vinocur y Altman, 2005; Hayano-Kanashiro *et al.*, 2009; Vaseva *et al.*, 2011; Sun *et al.* 2013; Charffedinne *et al.*, 2015).

DEHIDRINAS

Las dehidrinas (DHN) son proteínas que pertenecen al grupo dos de las proteínas llamadas LEA, por su nombre en inglés late embryogenesis abundant (abundantes en la embriogénesis tardía) (Barker *et al.*, 1988; Dure *et al.*, 1989). Las proteínas LEA han sido clasificadas de diferentes formas (Dure, 1993; Battaglia *et al.*, 2008). Según la clasificación de Battaglia se consideran siete grupos, de acuerdo a la presencia de sus dominios conservados, la mayoría hidrofílicos y que más adelante se detallará (Battaglia *et al.*, 2008).

En general, las LEA son proteínas que se acumulan en estructuras tolerantes a la desecación como es la semilla (Barker *et al.*, 1988; Dure *et al.*, 1989; Shih *et al.*, 2010; Lan *et al.*, 2013), también están presentes en tejidos vegetales sujetos a condiciones de estrés como sequía, bajas temperaturas y salinidad (Pieters y Souki, 2005; Hu *et al.*, 2009; Lui *et al.*, 2011; Amara *et al.*, 2012; 2013; Rosales *et al.*, 2014). Además se han encontrado en bacterias (Shih *et al.*, 2010; Rosales *et al.*, 2014), hongos (Filiz *et al.*, 2013; Garay-Arroyo, 2000) y en algunos invertebrados como los nematodos (Filiz *et al.*, 2013; Goyal *et al.* 2005). No obstante que se han descrito hace más de 20 años, aún se desconoce la forma en la que actúan (Battaglia *et al.*, 2008; Brini *et al.*, 2007; 2011; Wang *et al.*, 2014; Charffedinne *et al.*, 2015).

Las dehidrinas se encontraron por primera vez en la semilla de algodón por Dure y su grupo de investigación (Barker *et al.*, 1988; Dure *et al.*, 1989), desde entonces han sido ampliamente estudiadas, ya que se consideran proteínas con funciones protectoras en la célula de las condiciones de estrés abiótico. Sin embargo, recientemente, se identificaron dehidrinas constitutivas, lo que quiere decir que aún en condiciones normales están presentes (Rorat *et al.*, 2006, Burrieza *et al.*, 2012; Charffedinne *et al.*, 2015).

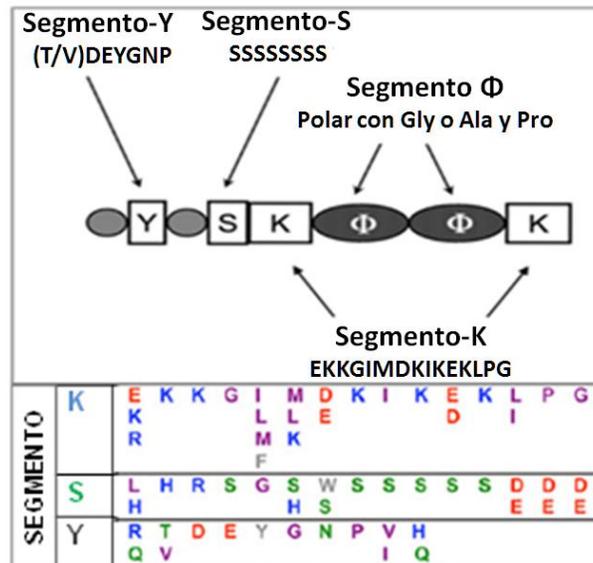


Figura 6. Segmentos presentes en las Dehidrinas LEA 2 y los aminoácidos consenso de cada uno de los segmentos (Battaglia *et al.*, 2008).

Las dehidrinas también son llamadas RAB por ser blanco de la hormona ABA (responsive to ABA). Se caracterizan por contener un segmento conservado rico en lisina, llamado segmento-K (EKKGIMDKIKEKLP) que se ubica en la región C-terminal de la proteína (Close *et al.*, 1993; 1997; Battaglia *et al.*, 2008). Este segmento se puede encontrar de 1 a 11 copias y puede formar α hélices anfipáticas. Otros segmentos característicos de muchas dehidrinas son: el segmento-Y ([V/T]D[E/Q]YGNP), el cual, se puede encontrar de 1 a 3 copias en la región N-terminal, y el segmento-S, que es una serie de residuos de serinas, que puede ser fosforilado (Weller, 1979; Barker *et al.*, 1988; Dure *et al.*, 1989; Villardel *et al.*, 1990; Riera *et al.*, 2004; Alsheikh *et al.*, 2003; 2005; Rahman *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2011; 2013). Por último, las dehidrinas contienen otro segmento menos conservado llamado ϕ , rico en glicina o una combinación de prolina y alanina. Este segmento se localiza entre dos segmentos-K (Close *et al.*, 1989; 1993; Campbell y Close, 1997) (Figura 6). Otra característica de las dehidrinas es que son proteínas con un alto contenido de aminoácidos polares y cargados, lo que las hace hidrofílicas y termosolubles, es decir, que con tratamientos térmicos no pierden solubilidad. Las dehidrinas también son consideradas proteínas intrínsecamente desordenadas (IDPs/IUPs) al no tener una conformación terciaria definida, como ocurre comúnmente con las proteínas (Nylander 2001; Dunker 2002; 2008; Tompa *et al.*, 2002; 2006; 2010; Xue *et al.*, 2012; Rosales *et al.*, 2014). Se dice que la falta de estructura les confiere

ciertas características, como unirse a diferentes blancos, lo cual puede estar relacionado con la actividad sugerida y su capacidad protectora (Dyson, 2005)..

CLASIFICACIÓN DE LAS DEHIDRINAS

La clasificación de las DHN depende de la presencia de los segmentos antes mencionados. Esta clasificación divide en 5 grupos a las dehidrinas: YSK, SK, K, KS y YK. Como se observa en la figura 7, todos los grupos de las dehidrinas contienen el segmento-K, esto por ser un dominio conservado y característico de las DHN. En varios estudios se ha encontrado que el segmento-K es esencial para el funcionamiento protector de las dehidrinas (Drira *et al* 2013; 2015; Rosales *et al*, 2014). Sin embargo, aún se trata de correlacionar el tipo de DHN de acuerdo a su clasificación y su funcionamiento (Nylander *et al.*, 2001; Allagulova *et al.*, 2003; Vaseva *et al.*, 2010; 2011; 2014; Burrieza *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2014).

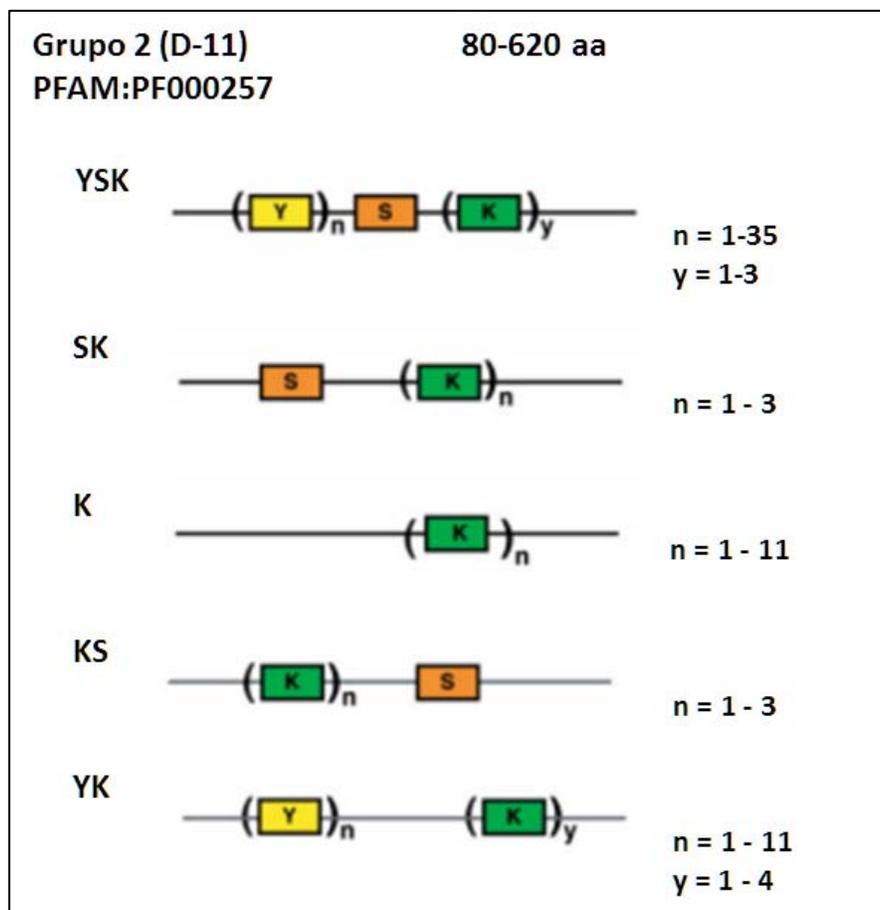


Figura 7. Clasificación de las dehidrinas respecto a los segmentos presentes.

LOCALIZACIÓN

La presencia del segmento-K es esencial para el funcionamiento de las DHN, así mismo, este segmento se considera un elemento importante para la interacción proteína-proteína y proteína-lípidos, por su estructura α -hélice anfipática (Dure, 1993; Svensson *et al.*, 2002; Koag *et al.*, 2009). Estas interacciones permiten que las dehidrasas se acumulen principalmente en el citoplasma y en el núcleo de la célula, Sin embargo, también han sido encontradas en la membrana plasmática, mitocondrias, vacuolas, vesículas y retículo endoplásmico de manera periférica como se observa en la figura 8. (Houde *et al.*, 1995; Egerton-Warburton *et al.*, 1997; Danyluk *et al.*, 1998; Borovskii *et al.*, 2002; Koag *et al.*, 2009; Popova *et al.*, 2011).

FUNCIONES

En general, se considera que las dehidrasas tienen la capacidad de proteger a las células ante diversos daños causados durante algún tipo de estrés biótico y abiótico. Algunos estudios sugieren la participación de las dehidrasas en el metabolismo celular, la regulación transcripcional, la tolerancia a estrés abiótico y la señalización durante el estrés abiótico (Ozturk *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003; Hara, *et al.*, 2003; 2004; 2005; Buchanana *et al.*, 2005; Brini *et al.*, 2007; Rosales *et al.*, 2014). De las funciones propuestas, las más estudiadas son las siguientes: La estabilización de macromoléculas, evitando o reduciendo su desnaturalización, como lo hacen las chaperonas (Kovacs *et al.*, 2008). La protección de la membrana ante la oxidación lipídica, mediante la unión del segmento-K a través de una estructura de α hélice anfipática, lo que le permite la interacción con la membrana lipídica (Lui *et al.*, 2001; Rahman, 2010; 2011). La crioprotección (Hughes y Graether, 2011; Hughes *et al.*, 2013) y la termoestabilización (Brini, 2010; Drira, 2013) de algunas proteínas. De esta forma las enzimas como la lactato deshidrogenasa (LDH) y la malato deshidrogenasa (MDH), por ejemplo, mantienen su actividad aún en las condiciones adversas antes mencionadas (Goyal *et al.*, 2005; Rosales *et al.*, 2014). La unión a metales como Ni, Zn y Ca (Alsheikh *et al.*, 2003; 2005; Lui *et al.*, 2015). La capacidad antioxidante, ya que disminuye la acumulación de las especies reactivas oxidantes (ROS) o las bloquea como se muestra en la figura 8 (Brini *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2013; Rosales *et al.*, 2014). La interacción y estabilización de DNA y RNA (Hara *et al.*, 2009; Tunnacliffe *et al.*, 2010)

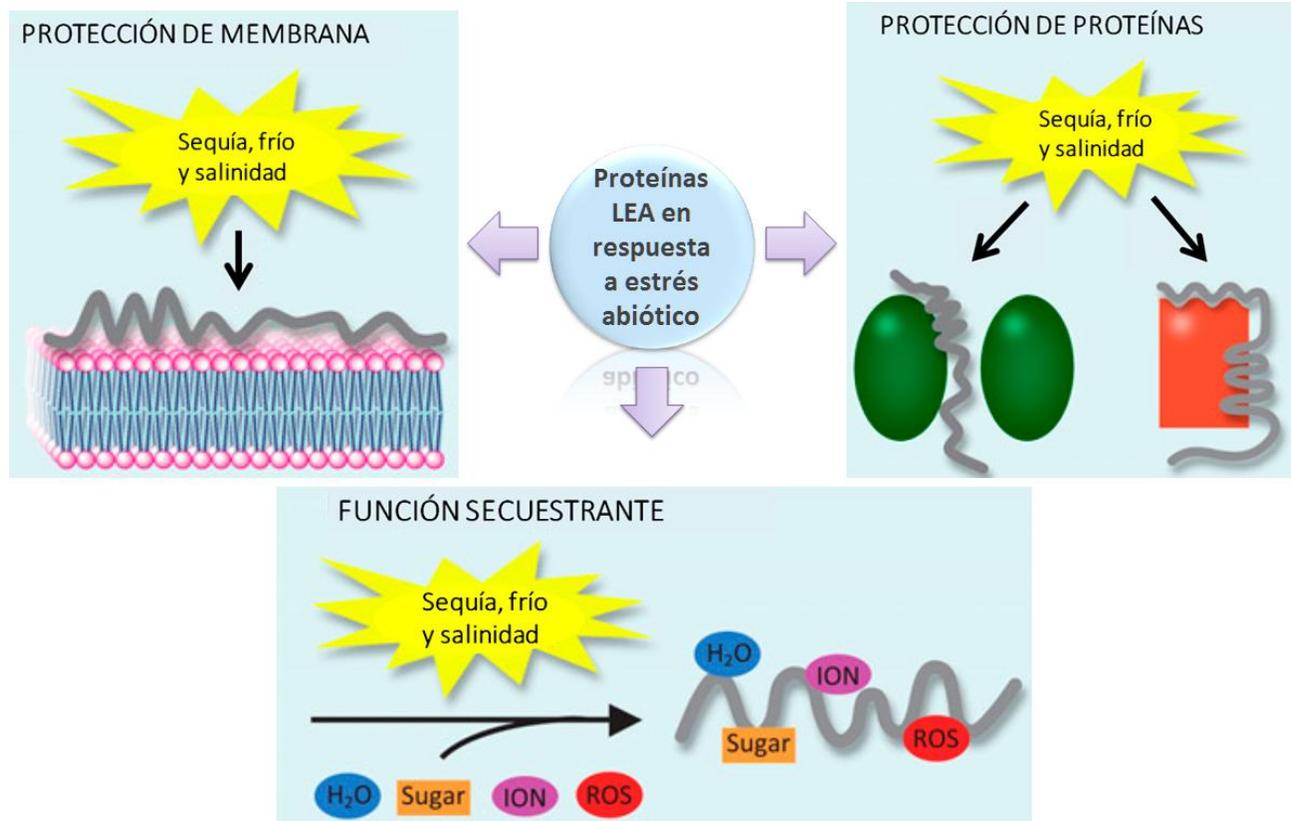


Figura 8. Modelos propuestos de acción de las proteínas LEA. LEA IDPs (espiral gris) protegen células vegetales contra el estrés abiótico mediante funciones secuestrantes (I), unión a membranas (II), y protección a enzimas (ovalo verde) y otras proteínas (rectángulo rojo) (III) (Sun *et al.*, 2013).

ORGANISMOS TRANSGÉNICOS

Dadas las características protectoras de las LEA, se han sobreexpresado estas proteínas en diferentes organismos con dehidrasinas de la misma especie o de otra similar y se ha observado que estos organismos transgénicos presentan un incremento en su tolerancia a sequía, salinidad y altas o bajas temperaturas (Godoy *et al.*, 1994; Ismail *et al.*, 1999; Hu *et al.*, 2009; Hanin *et al.*, 2011).

Algunos ejemplos son la expresión de los genes: *DHN5* de trigo en *A. thaliana* (Brini *et al.*, 2007; 2011), *PMA80* de trigo en arroz (Cheng *et al.*, 2002), *Rab17* de maíz en *A. thaliana* (Figueras *et al.*, 2004), *Rab16* y *Rab21* de arroz en tabaco (Roychoudhury *et al.*, 2007). En todos estos casos se observó que las plantas adquirieron tolerancia a salinidad y sequía. La sobreexpresión del gen *ShDHN* en jitomate (Liu *et al.*, 2015) y *Rab18* en *A. thaliana*

(Puhakainen *et al.*, 2004) les confirieron tolerancia a bajas temperaturas. El mismo resultado se obtuvo de la expresión de *CuCOR19* en tabaco (Hara *et al.*, 2003).

Un buen ejemplo de la tolerancia adquirida mediante sobreexpresión de dehidrinas en maíz es el trabajo realizado por Amara y su equipo (Amara *et al.*, 2013). En este trabajo se sobreexpresó el gen perteneciente a la dehidrina *Rab28* de maíz en la misma especie. Las plantas de maíz de la figura 9A pertenecen a la T2 obtenida por autopolinización de las plantas transgénicas, entre las cuales, la concentración del gen *Rab28* varía, como se puede observar en los resultados qRT-PCR. Estas plantas (C1, C6 y C4) muestran notables diferencias en condiciones de estrés con PEG en comparación con la variedad silvestre (WT). Como se observa en la figura 9, el estrés osmótico no afectó negativamente el crecimiento de las plantas T2, y se observó un aumento en el crecimiento como en la planta C4, la cual presento mayor cantidad de *Rab28* y mejor tolerancia al estrés osmótico en el mismo tiempo.

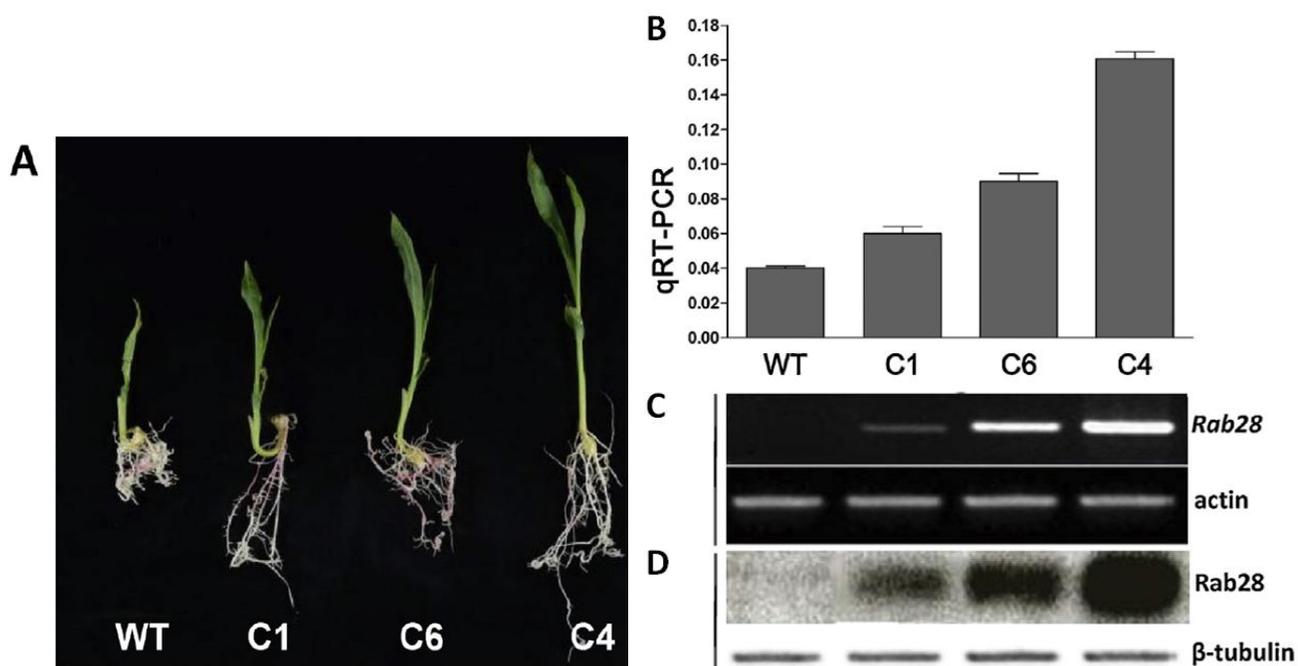


Figura 9. Efecto de la sobreexpresión de dehidrinas en plantas transgénicas de maíz sometidas a estrés osmótico. (A) Crecimiento (B) Estimación del número de copias de *Rab28* (C) mRNA de *Rab28* (D) Proteína *Rab28* en hojas de maíz. Como referencia de carga actina y β - tubulina (Amara *et al.*, 2013).

A pesar de los buenos resultados en la generación de plantas transgénicas, el proceso para obtenerlas es considerablemente laborioso, por lo que en algunos trabajos se ha optado por expresar genes LEA de plantas en microorganismos. Esto con el fin de estudiar la función de las LEA ante diferentes tipos de estrés de una forma más acelerada. Algunos ejemplos de la expresión de dehidrinas en *E. coli* son los siguientes: la *DHN1* perteneciente a la uva le confiere a la bacteria resistencia a bajas temperaturas (Rosales *et al.*, 2014); *ZLDE-2* de soya permite su crecimiento en salinidad (Lui y Zheng, 2005); *EMB564*, *Rab17* y *Mlg3* aumenta su tolerancia a bajas temperaturas, calor y desecación (Amara *et al.*, 2012); y la *DHN5* de trigo mejora su tolerancia a salinidad, calor y bajas temperaturas (Drida *et al.*, 2013).

Otro microorganismo extensamente usado para estos fines, es *Saccharomyces cerevisiae*, con la expresión de *HVA1* de cebada (Zhang *et al.*, 2000), la *TaLEA2* y *TaLEA3* del trigo (Yu *et al.*, 2005), y la *LE25* y *LE4* del jitomate (Zhang *et al.*, 2000); en donde se observa que aumenta la resistencia a salinidad y bajas temperaturas de *S. cerevisiae*.

La figura 10 ilustra un trabajo en donde se expresan tres LEA de maíz en *E. coli* y se se somete a la bacteria a tres tipos de estrés: calor, frío y sequía con PEG. En todos los casos se observó un aumento en la tolerancia de *E. coli* a los tres tipos de estrés evaluados (Amara *et al.*, 2012)

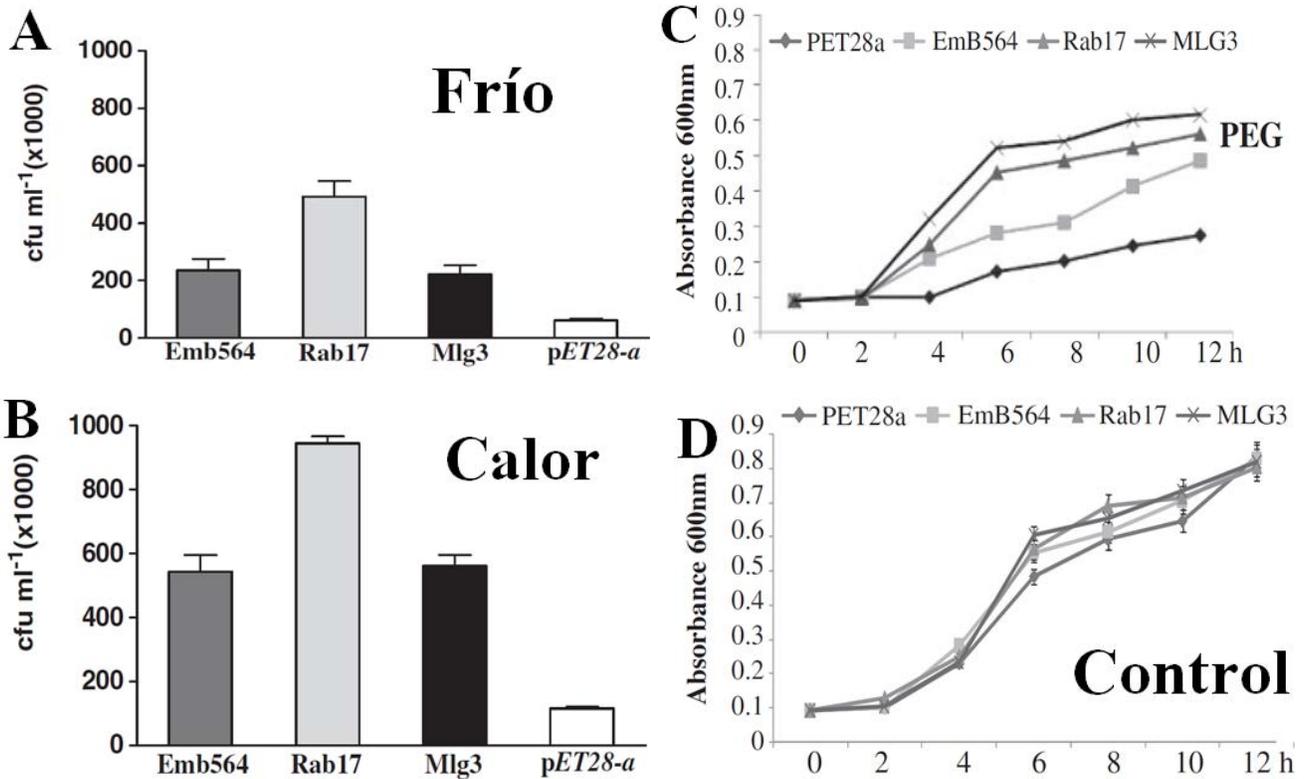


Figura 10. Expresión de tres genes LEA de maíz en *E. coli*. Supervivencia de *E. coli* en frío (A), calor (B) donde se usó el vector pET28 α como control, PEG (C) y condiciones óptimas para el crecimiento de *E. coli* (D).

Justificación

El maíz es el cereal más importante de México, este ocupa el primer lugar de la producción de cereales con un promedio de 21.6 millones de toneladas anuales y representa el 65 % de la producción total de cereales (SIAP, 2013). En cuanto al consumo, el maíz es la base de la alimentación del mexicano.

Los principales estados productores de maíz en México son: Sinaloa, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Guanajuato, Chiapas y Chihuahua (SIAP, 2013). La mayoría de estos estados cultivan maíz por temporal y se encuentran en zonas que presentan sequías que van de moderadas a extremas. Las sequías afectan el crecimiento, desarrollo del cultivo y en consecuencia el rendimiento en la producción del maíz. En muchas ocasiones se pierden grandes hectáreas de cosecha debido a este fenómeno.

Dada la importancia del maíz y su producción en México, así como a nivel mundial es imprescindible encontrar la manera de disminuir la pérdida de cosecha, y aún incrementarla.

Durante condiciones de estrés, la planta de maíz, lleva a cabo múltiples reacciones, donde se sintetizan diversas proteínas, con el fin de proteger a las células de daños causados por el estrés. Entre las proteínas sintetizadas en estas condiciones se encuentran las dehidrinas que se ha sugerido le otorgan a la planta tolerancia a diversos factores de estrés abiótico como son sequía, calor, frío y salinidad (Barker *et al.*, 1988; Dure *et al.*, 1989).

Con el fin de disminuir la pérdida de cosecha del maíz por sequía, se busca incrementar la síntesis de dichas proteínas, que le confieran una mayor tolerancia en estas condiciones de sequía. En varios estudios se ha observado una correlación entre la síntesis de dehidrinas y la tolerancia a estrés (Hanin, *et al.*, 2011). Asimismo, numerosos estudios en donde se ha incrementado la concentración de dehidrinas a plantas o microorganismos y se ha demostrado un aumento en el grado de tolerancia a este tipo de estrés (Tunnacliffe y Wise, 2007). Por lo que en esta investigación se plantea analizar el perfil global de dehidrinas presente en las plantas de maíz Tuxpeño normal, compararlo con el perfil de global de

dehidrinas de las líneas tolerante y sensible e identificar la(s) dehidrina(s) más abundante(s) en la línea tolerante, la(s) cual(es) podría(n) ser la(s) responsable(s) de la tolerancia a sequía.

Hipótesis

En condiciones de estrés por sequía, las plantas de maíz tolerantes a esta condición presentarán un perfil global de dehidrinas superior a una variedad no seleccionada o sensible.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

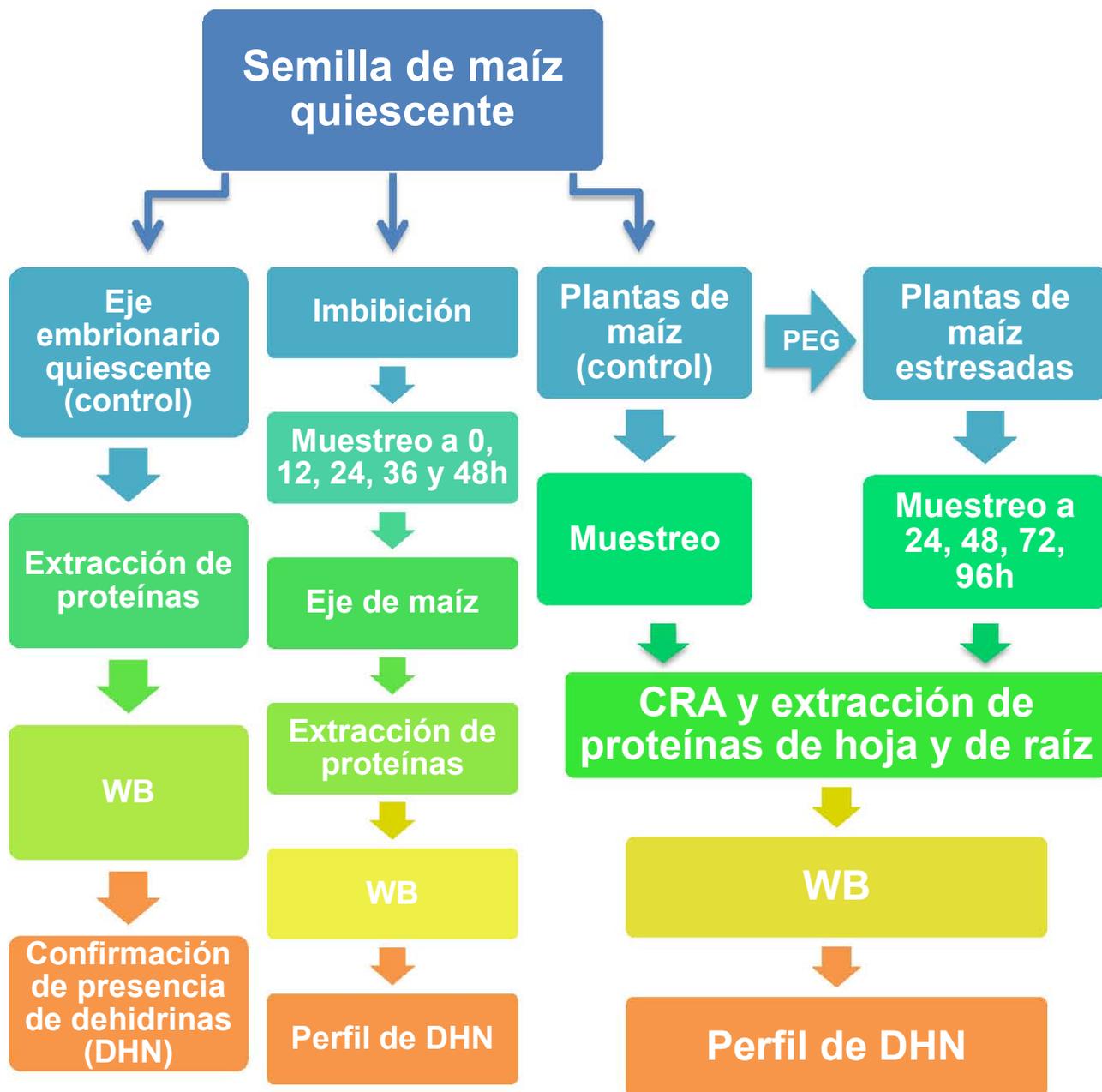
Demostrar que el contenido de dehidrinas está asociado con la tolerancia de la planta a la sequía.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Examinar las dehidrinas inducidas en respuesta a estrés hídrico en diferentes tejidos de la planta de maíz: la parte aérea de la plántula, que comprende hoja y tallo, y la parte presente en el suelo, la raíz.
2. Comparar los resultados anteriores de una línea tolerante a sequía y otra sensible, en los mismos tejidos.
3. Identificar la(s) dehidrina(s) más abundante(s) en tejidos de maíz sometidos a estrés hídrico en el maíz normal y en el maíz tolerante a sequía.

Diseño Experimental

A continuación se presenta un diagrama de flujo que muestra los procedimientos empleados durante este trabajo.



Materiales y métodos

Estandarización de la detección de dehidrinas con el anticuerpo antisegmento-k

❖ Material biológico

Eje embrionario quiescente de maíz raza Tuxpeño.

❖ Extracción de Proteínas

Se realizó la disección de semillas de maíz de raza Tuxpeño con el propósito de obtener los ejes embrionarios de maíz. Posteriormente, para obtener la proteína se trituraron 0.1 g de los ejes con nitrógeno líquido y se colocaron en un vial con 1:1 m/v de solución amortiguadora E (100 mM tricina, 5 mM de $MgCl_2$, 10 mM $NaHCO_3$, 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM benzamida y 1 mM de Cocktail Complete marca Bio-Rad), se agitó vigorosamente y se centrifugó a 15000 xg por 10 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se trasvaso a dos viales. Uno se calentó a 100°C por 10 min e inmediatamente se enfrió en hielo durante 30 min, al segundo vial no se le dio este tratamiento. Pasado los 30 min los dos viales se volvieron a centrifugar a 15000 xg por 10 min a 4°C. Se les agregó TCA al 3 % a los dos viales y 15 min después se volvieron a centrifugar. Se tomó el sobrenadante y se pasó a otro vial, al que se le agregó TCA al 25 % para precipitar las proteínas no estructuradas. El pellet se disolvió en 200 μ L de solución amortiguadora IEF (8 M urea, 2 M tiourea, 4 % CHAPS, 2 % tritón X-100 y 50 mM DTT).

❖ Cuantificación de Proteínas Totales por el Método de Bradford

Para cuantificar la proteína presente se usó la técnica de Bradford de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Protein Assay Bio-Rad). En un tubo Falcon se preparó la solución de Bradford, en donde por cada 0.8 mL de agua, se añadieron 0.2 mL del reactivo de Bradford por cada muestra a cuantificar. Posteriormente, en las celdas se añadió 1 mL de la solución de Bradford y 2 μ L de la proteína de ejes embrionarios de maíz quiescente. La absorbancia se leyó a 595 nm. Una vez obtenida la absorbancia se sustituyeron los valores en la ecuación de la regresión lineal de la curva estándar con BSA con valores de 0.1 a 1 mg/mL .

❖ Separación de Proteínas por Electroforesis en Gel de Poliacrilamida-SDS

Para la electroforesis se cargaron, en un gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE) al 16%, 10 μ L del marcador de peso molecular dual color de Bio-Rad y 40 μ g de proteína de cada una de las muestras, las cuales fueron preparadas al 20% con solución amortiguadora de carga (20% de glicerol, 5% de β -mercaptoetanol, 20% de azul bromofenol). La corriente eléctrica de

la cámara se fijó a 80 V por 30 min y después a 100 V hasta que el frente de corrida del gel SDS-PAGE saliera (Gallagher, 2006).

❖ Inmunoréplica tipo Western Blot (WB) para la detección de DHN

Las proteínas separadas en el gel de acrilamida se transfirieron a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF), mediante una transferencia húmeda con solución de transferencia (12.5 mM Tris-HCl, 96 mM glicina, 20 % de metanol) a 100 V durante 1 h como lo indica el manual de Western Blot (Millipore). La membrana se bloqueó con una solución al 5 % de leche descremada Svelty disuelta en amortiguador TBS (50 mM Tris-HCl a pH 7.5 y 150 mM NaCl). Después, se hizo la inmunodetección con el anticuerpo antisegmento-K policlonal de Agrisera (Koag *et al.*, 2009; Burrieza *et al.*, 2012; Rosales *et al.*, 2014). Para estandarizar las condiciones de inmunodetección, se probaron diferentes diluciones del anticuerpo: 1:1000, 1:3000 y 1:5000. Se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y en agitación. Se hicieron 3 lavados con 10 mL de solución amortiguadora TBS durante 5 min cada uno y con agitación. Después se añadió el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa 1:10000 en una solución al 5 % de leche descremada, en la cual se incubó la membrana por 1 h y se repitieron los lavados. Finalmente se realizó el revelado con Luminata Crescendo Western Substrate Millipore y se fotografió con el equipo de Biorad ChemicDoc MP Imaging System.

PERFIL DE DEHIDRINAS EN SEMILLAS DE MAÍZ DURANTE IMBIBICIÓN

❖ Material

Semillas de maíz raza Tuxpeño

❖ Germinación

Las semillas se germinaron en algodón humedecido con agua durante 48 h a 28°C. Después de la imbibición se obtuvo el eje de las semillas germinadas a 0, 12, 24, 36 y 48 h. Se extrajo la proteína de dichas muestras con el mismo método antes descrito y se procedió a hacer un WB usando la dilución del anticuerpo antisegmento-K de 1:3000.

DETECCIÓN DE DEHIDRINAS PLANTAS DE MAÍZ SOMETIDAS A ESTRÉS POR SEQUÍA

❖ Material

Semillas de maíz de la raza Tuxpeño y de las líneas 14 (tolerante) y 13 (sensible) obtenidas del Programa de Genética, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados.

❖ Germinación y crecimiento

Las semillas se germinaron durante cuatro días en algodón con agua a 28°C, una vez que empezó a salir la radícula se realizó el trasplante a un semillero con la fórmula 3 de la marca Sunshine, agrolita y vermiculita en proporción 3:1:1, donde las plántulas crecieron por tres semanas a 28°C ± 2 con riego cada tercer día a capacidad de campo, en el invernadero de la Facultad de Química, de la UNAM. Una vez a la semana, las plántulas fueron regadas con solución nutritiva N6 (Nitrógeno 203 ppm, Fósforo 50 ppm, Potasio 236 ppm, Calcio 200 ppm y Magnesio 48 ppm). A las cuatro semanas después del trasplante, las plántulas habían desarrollado cuatro hojas completamente desplegadas. Pasado este tiempo se trasplantaron a un medio con 30 % de Polietilenglicol 8000 (PEG), con el fin de llevarla a un estado de sequía y obtener el estrés donde se observara la síntesis de dehidrinas. El control no se trasplantó a PEG y se continuó regando. Se tomaron muestras de hojas y raíces del control y de las plantas de maíz a las 24, 48, 72 y 96 h después del trasplante al medio con PEG.

❖ Extracción de Proteínas Totales

Para preparar las muestras de hoja y de raíz, primero, se trituraron con nitrógeno líquido. Posteriormente, a 1 g de la muestra triturada se le añadió 1 mL de solución amortiguadora E (100 mM triacina, 5 mM de MgCl₂, 10 mM NaHCO₃, 5 mM EDTA, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM benzamida y 1 mM de Cocktail Complete marca Bio-Rad) se agitó vigorosamente y se centrifugó a 15000 xg por 10 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se trasvasó a un vial, en donde se le agregó 1:1 la solución de extracción fenólica (100 mM Tris-HCl, fenol pH 8.8, 10 mM EDTA, 900 mM sacarosa y 0.4 % de β-mercaptoetanol), se agitó vigorosamente y se centrifugó a 15000 xg por 10 min a 4°C. Una vez formadas las fases, se tomó la fase orgánica y se trasvasó a otro vial. Se añadieron 5 volúmenes de una solución acetato de amonio/metanol (100mM acetato de amonio en 100 % metanol) y se incubó a -20°C durante toda la noche. Después se centrifugó a 15000 xg por 10 min a 4°C. Finalmente se tomó la pastilla y se lavó dos veces con la solución de acetato/metanol y dos veces más con acetona

al 80 %. Se secó y se disolvió en 200 µL de solución amortiguadora IEF (8 M urea, 2 M tiourea, 4 % CHAPS, 2 % tritón X-100 y 50 mM DTT).

Posteriormente, se cuantificó la proteína en las muestras mediante la técnica de Bradford y se realizó la electroforesis con geles de acrilamida SDS al 13 % y posteriormente el WB en las mismas condiciones que en los experimentos anteriormente descritos.

❖ **Cuantificación de Contenido de Relativo de Agua (CRA)**

Para cuantificar el CRA se siguió el método descrito por Shekhawat (Shekhawat *et al.*, 2011). Primero, se pesaron las hojas frescas (PF) de cada una de las plantas de maíz colectadas a las 0, 24, 48,72 y 96 h en PEG por triplicado. Luego, las hojas se colocaron en cajas de Petri con agua durante 24 h a 4°C, pasado ese tiempo, las hojas se secaron con toallitas para eliminar el agua superficial y se pesaron para obtener el peso turgente (PT). Finalmente, se secaron en un horno a 60°C durante 48 h para obtener el peso seco (PS). El porcentaje de CRA se calculó mediante la siguiente ecuación

$$\%CRA = \text{————}$$

Resultados

DETECCIÓN DE DEHIDRINAS EN SEMILLA

Para el análisis inicial de las dehidrinas fue necesario confirmar su presencia y estandarizar el procedimiento de extracción de proteína y de la técnica del WB usando proteína de ejes embrionarios de maíz quiescente raza Tuxpeño, ya que estas proteínas se sabe están presentes en las semillas (Close *et al.*, 1993; 1997; Campbell y Close, 1997). Se probaron dos condiciones para la detección de dehidrinas en el eje embrionario de maíz quiescente raza Tuxpeño con tratamiento térmico y sin tratamiento térmico, el cual constó de colocar el vial con la solución de proteína a 100°C durante 10 min, para detectar a la proteína mediante el anticuerpo antisegmento-K. Se probaron diferentes diluciones, la de 1:1000 es la aconsejada por el proveedor, otra de 1:3000 y una de 1:5000 (Figura 11).

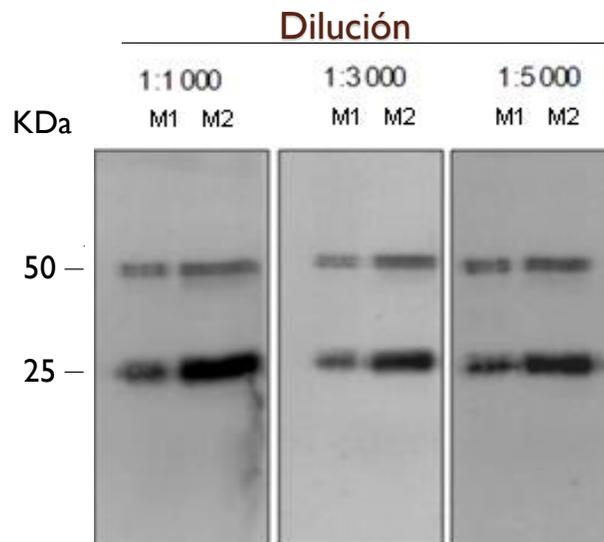


Figura 11. Estandarización de la detección de dehidrinas con el anticuerpo antisegmento-K en proteínas de ejes embrionario de maíz quiescente Tuxpeño. Inmunoréplica tipo Western de proteínas de ejes embrionarios de maíz, con diferentes diluciones del anticuerpo antisegmento-K. Para cada dilución, el carril M1 corresponde a la proteína sin tratamiento térmico y el carril M2 a la proteína con tratamiento térmico (100°C, 10 min). En cada carril se cargaron 15 µg de proteína total.

En la figura 11 se observaron en cada carril dos bandas inmunodetectadas con el anticuerpo a todas las diluciones probadas, una de 25 y otra de 50 kDa. Sin embargo, la muestra tratada

térmicamente a cualquiera de las diluciones probadas es más intensa. Por lo anterior, el tratamiento de calor enriqueció de dehidrinas a la muestra. También, al analizar la figura 11 se puede observar que la dilución de 1:3000 es la que produce una señal comparable a la dilución 1:1000, por lo que se eligió esta dilución para economizar el anticuerpo.

Una vez que se comprobó la presencia de dehidrinas en los ejes embrionarios de maíz quiescente se procedió a estudiar los niveles de dehidrinas durante la germinación. Al proceso de toma de agua que inicia el proceso de germinación, es llamado imbibición. Para este experimento, se diseccionaron los ejes de la semilla de maíz en imbibición a las 12, 24, 36 y 48 h y se extrajo la proteína de ellos. Los ejes embrionarios quiescentes fueron considerados como el control, es decir, la muestra a las 0 h.

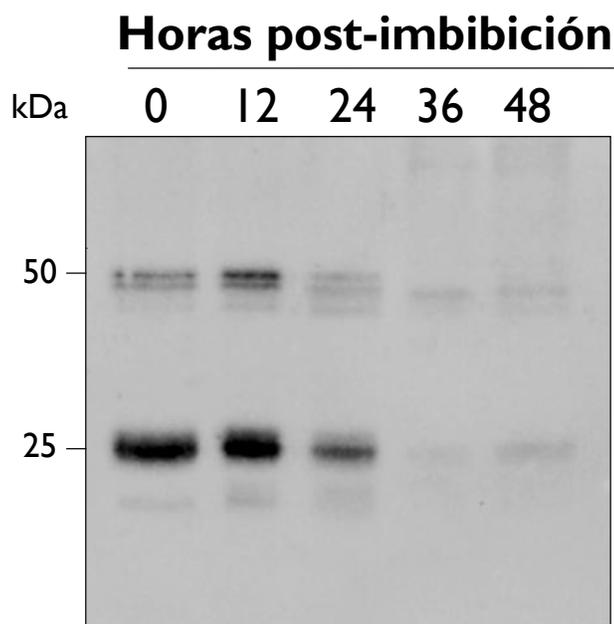


Figura 12. Perfil de dehidrinas en semillas de maíz Tuxpeño durante la imbibición. Inmunoréplica tipo Western de proteínas de semilla de maíz germinada a diferentes tiempos. Se cargaron 15 µg de proteína total de semilla por carril.

En la figura 12 se observa la disminución de los niveles de dehidrinas en los ejes embrionarios de maíz, conforme avanza la germinación. En este WB, al igual que en la figura 11, se observan principalmente dos bandas, una de 50 kDa y otra de 25 kDa. Sin embargo, también se observan otras bandas de menor intensidad.

Para finalizar con los experimentos de semilla, se procedió a evaluar la presencia de dehidrinas de las dos líneas contrastantes de maíz, la tolerante y la sensible. Para esto se corrió un gel con las proteínas obtenidas de los ejes embrionarios de las diferentes semillas.

A.

B.

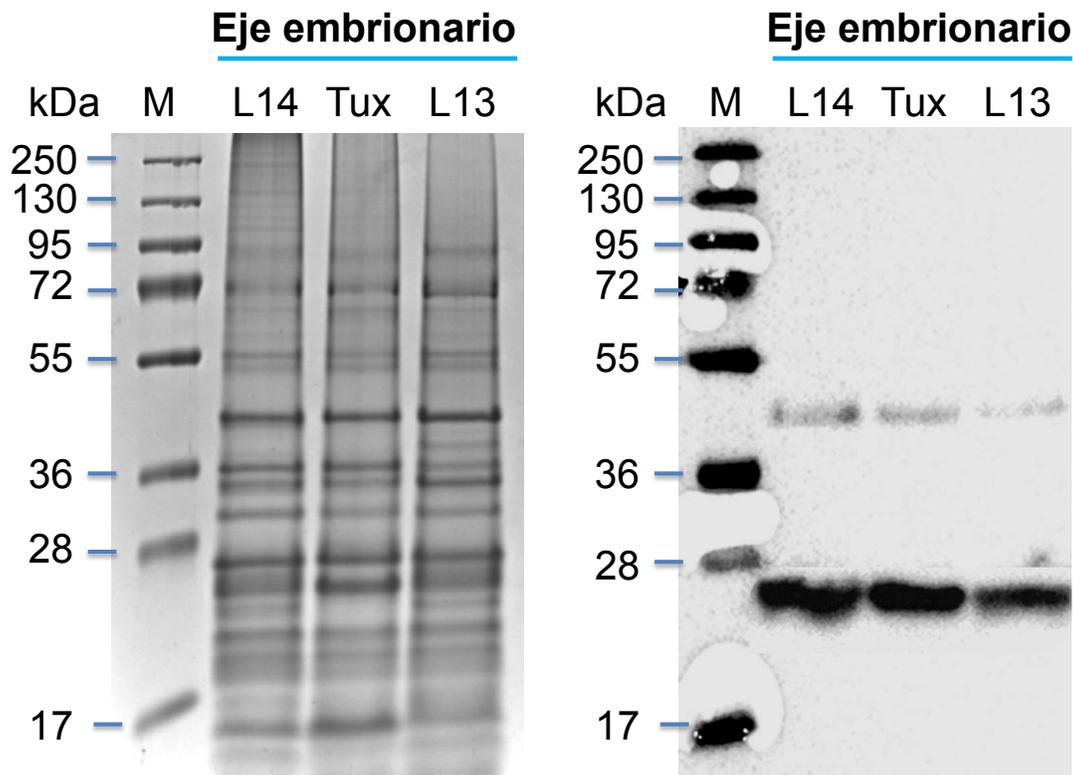


Figura 13. Comparación del perfil de dehidrinas presentes en los ejes embrionarios de maíz quiescente de la raza Tuxpeño (Tux), línea tolerante (L14) y línea sensible (L13). A. Gel de poliacrilamida SDS 13% teñido con azul de Coomassie coloidal **B.** Inmunoréplica tipo Western usando el anticuerpo contra el segmento-K de las dehidrinas. Se cargaron 15 µg de proteína total de semilla por carril.

Como se puede observar en la figura 13B, en el WB se observan dos bandas (25 kDa y 50 kDa) donde la primera es mucho más abundante que la de 50 kDa.

DETECCIÓN DE DEHIDRINAS EN PLANTAS DE MAÍZ SOMETIDAS A ESTRÉS POR SEQUÍA

Una vez confirmada la presencia de las dehidrinas en los genotipos de maíz estudiados, se investigó el perfil de estas proteínas en respuesta a estrés hídrico en las plantas de maíz de la raza Tuxpeño, y en las líneas tolerante y sensible.

En la figura 14A se observan los síntomas causados por el estrés hídrico en los tres genotipos de maíz evaluados. Las plantas de 24 y 48 h no muestran ningún síntoma y son comparables al control sin tratamiento (0 h). Sin embargo, a partir de las 72 h de estrés se pueden apreciar algunos daños en las hojas, como son regiones cloróticas y el enrollamiento de la hoja. Estos daños se acentúan a las 96 horas, ya que el tallo presenta pigmentación y las hojas se ven casi totalmente enrolladas y amarillas por la pérdida de clorofila.

En el caso de la línea tolerante, las plantas no muestran síntomas a las 24 y 48 h y son comparables a las plantas control. Sin embargo, a partir de las 72 h ya se pueden apreciar algunos daños en las hojas, como son regiones cloróticas y el enrollamiento de la hoja (Figura 14B). Estos daños son más notorios a las 96 h, no obstante los daños no son tan severos como en la raza Tuxpeño.

Finalmente, en las plantas de la línea sensible se pueden observar los efectos del estrés por sequía a partir de las 24 h, ya que las plantas presentan daños en las hojas, como son pérdida de turgencia, de clorofila y el enrollamiento de la hoja (Figura 14C). Estos síntomas se intensifican conforme aumenta el tiempo de tratamiento con PEG 8000.

A.

Horas de aplicación de PEG – 8000 a maíz Tuxpeño



B.

Horas de aplicación de PEG – 8000 a maíz línea tolerante (L14)



Horas de aplicación de PEG – 8000 a maíz línea sensible



Figura 14. Síntomas de las plantas de maíz tratadas con PEG 8000 por 96 h. El tiempo 0 h corresponde a las plantas control, sin tratamiento. **A.** Raza Tuxpeño **B.** Línea tolerante a sequía **C.** Línea sensible a sequía

Contenido relativo de agua y sobrevivencia de las plantas sometidas a estrés hídrico

Se cuantificó el contenido relativo de agua (CRA) en los tejidos para determinar el efecto del tratamiento con PEG. En la figura 15 se presenta la relación del contenido relativo de agua en las plantas de maíz raza Tuxpeño, línea tolerante y línea sensible contra el tiempo que fueron expuestas a PEG 8000.

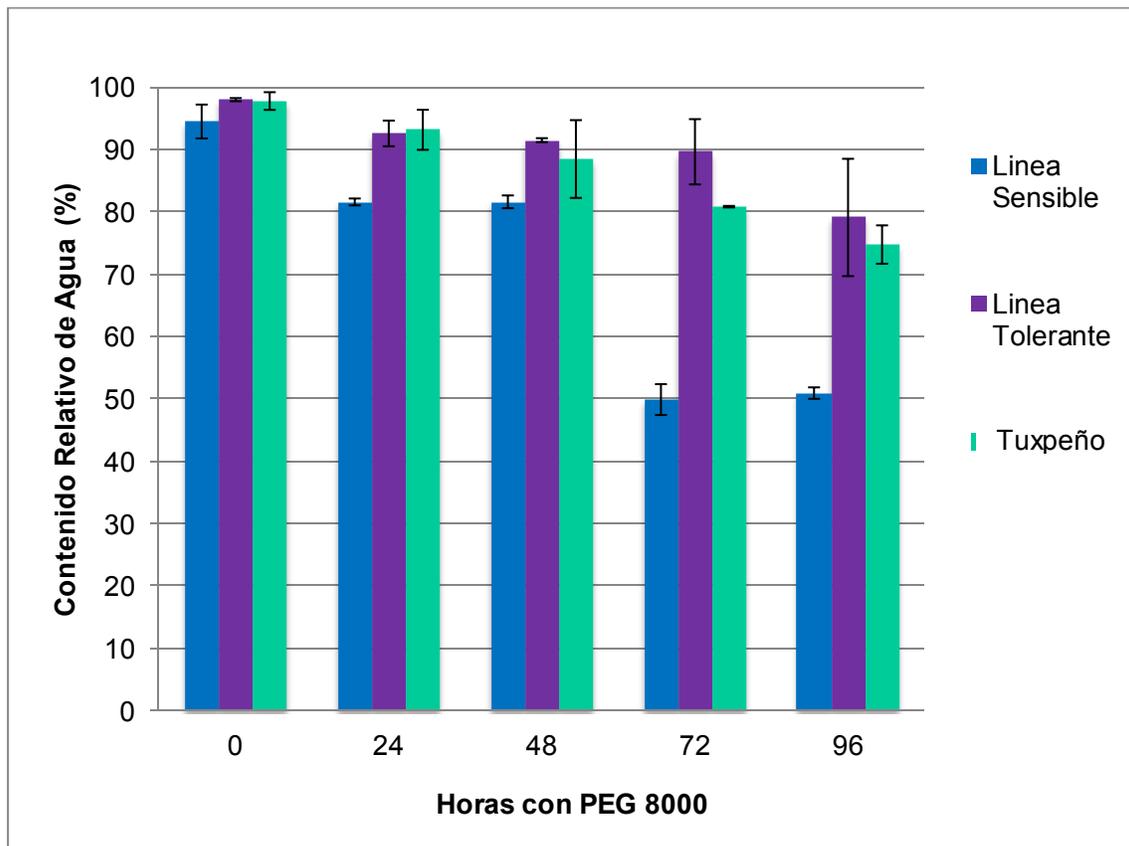


Figura 15. Contenido relativo de agua (%) en plántulas de maíz sometidas estrés con PEG 8000. Se muestra el promedio y la DS de 10 plantas.

Se puede apreciar que mientras aumenta el tiempo de exposición con PEG 8000, el contenido relativo de agua (CRA) disminuye. En la raza Tuxpeño normal hay una disminución del CRA entre las 0 h y las 96 h de un 25 % aproximadamente. En la línea tolerante la diferencia entre los mismos puntos es muy parecida a la raza Tuxpeño, ya que solamente disminuye un 20 %. Mientras que en la línea sensible esta disminución es mayor, ya que desde las 72 h el CRA decae un 30 % y al final del tratamiento alcanza una disminución del 40 %.

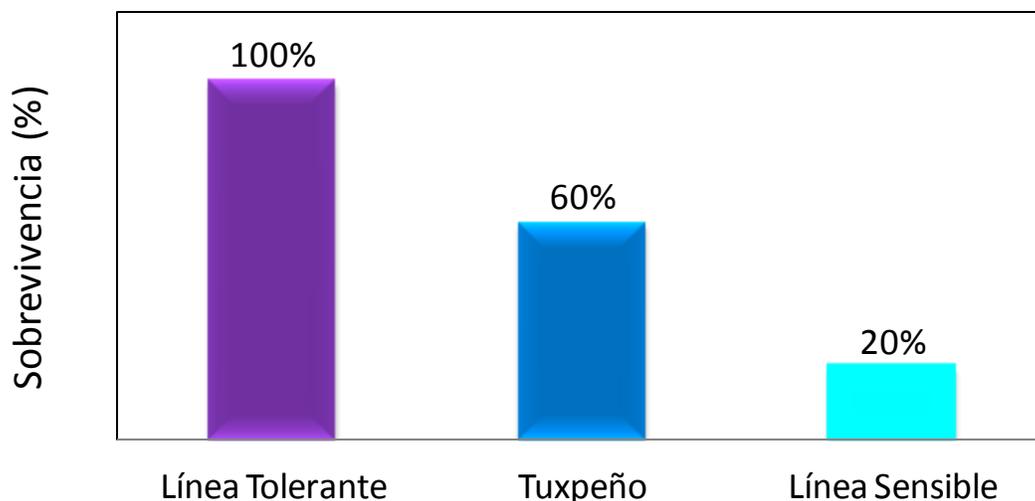


Figura 16. Porcentaje de plantas supervivientes ante el estrés con PEG 8000

También se analizó el efecto del estrés hídrico inducido por PEG en la supervivencia de las plantas. En la figura 16 se observa el porcentaje de plantas supervivientes al tratamiento con PEG-8000 durante 96 h. De los tres genotipos estudiados, sólo la línea tolerante mantuvo el 100 % de la plantas, mientras que la raza Tuxpeño tuvo una pérdida de un 40 % y la línea sensible, un 80 %.

Perfil global de dehidrinas en la parte aérea de las plantas de maíz

La presencia de dehidrinas se estudió en la parte aérea de las plantas de maíz de la raza Tuxpeño (figura 17), la línea tolerante (figura 18) y la línea sensible (figura 19), sometidas a estrés hídrico por el tiempo indicado.

En el WB realizado del extracto de proteínas de la parte aérea de las plantas de maíz raza Tuxpeño normal (figura 17) muestra 3 bandas inmunodetectadas por el anticuerpo antisegmento-K. De esas tres, dos son muy tenues. Una de estas se observa a un peso molecular de 150 kDa, la intensidad de esta banda disminuye conforme aumenta el estrés hídrico proporcionado por el PEG 8000 y no se había observado en los ejes embrionarios. Más abajo, en el WB, se aprecia una banda intensa de aproximadamente 50 kDa, cuyos niveles disminuyen de intensidad conforme aumenta la exposición a estrés hídrico, hasta que ya no es detectada a las 96 h. Finalmente, a las 48 y 96 h se observa la otra banda tenue de 20 kDa aproximadamente.

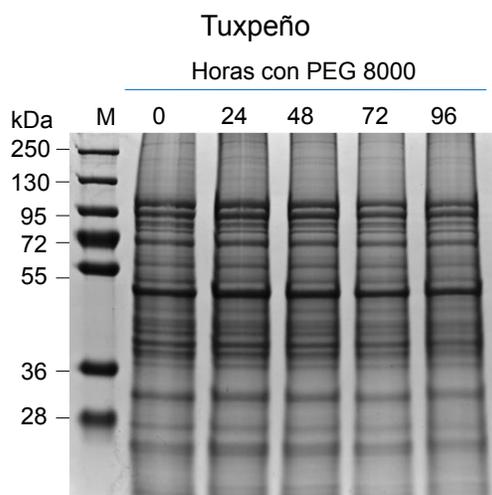
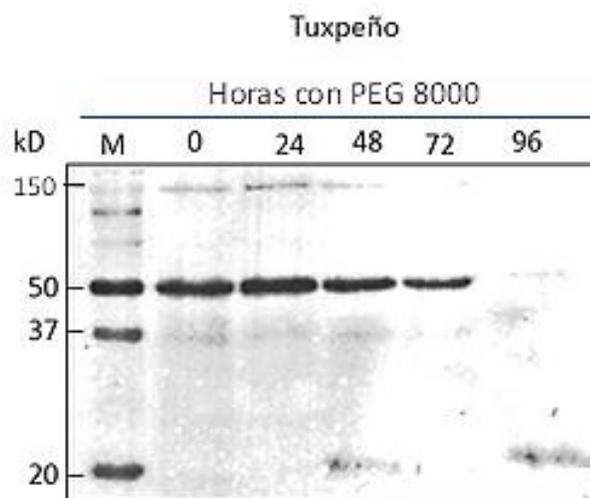
A.**B.**

Figura 17. Identificación de dehidrinas en la parte aérea de plántulas de maíz de la raza Tuxpeño sometidas estrés por sequía. En el primer carril se observa el marcador molecular. Los siguientes carriles corresponden a las proteínas de las plántulas tratadas con PEG 8000 durante 0, 24, 48, 72 y 96 h. **A.** Gel teñido con azul de Coomassie. **B.** Western Blot para detectar el segmento-K de las dehidrinas. Se cargaron 50 μ g de proteína total de parte aérea por carril.

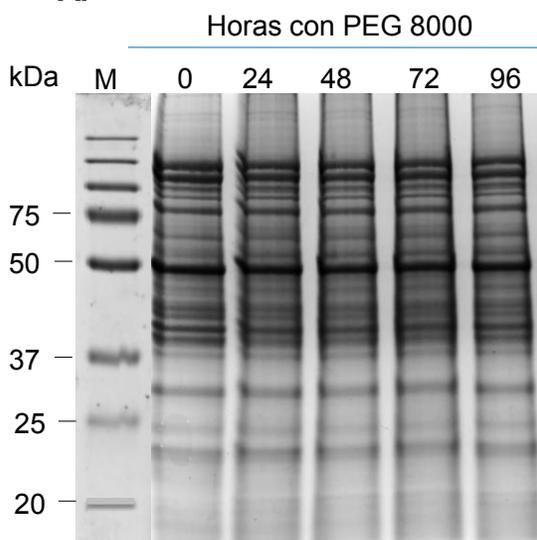
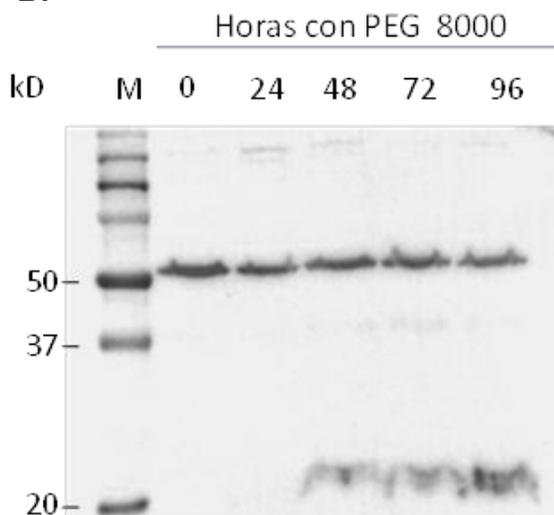
A.**Línea 14 (tolerante)****B.****Linea 14 (Tolerante)**

Figura 18. Identificación de dehidrinas en la parte aérea de plántulas de maíz de la línea tolerante sometidas estrés por sequía. En el primer carril se observa el marcador molecular. Los siguientes carriles corresponden a las proteínas de las plántulas estresadas con PEG 8000 durante 0 (el control), 24, 48, 72 y 96 h. **A.** Gel teñido con azul de Coomassie. **B.** Western Blot usando el antisección-K para detectar a las dehidrinas. Se cargaron 50 μ g de proteína total de parte aérea por carril.

En el WB de las proteínas de la parte aérea de las plantas de la línea tolerante (Figura 18), se observa una banda de aproximadamente 50 kDa en todos los tiempos de tratamiento y cuyos niveles se mantienen constantes, desde el tiempo 0 hasta las 96 h de aplicación de PEG 8000. Asimismo, se detecta una banda de aproximadamente 20kDa que se detecta a partir de las 48 h de aplicación de PEG 8000.

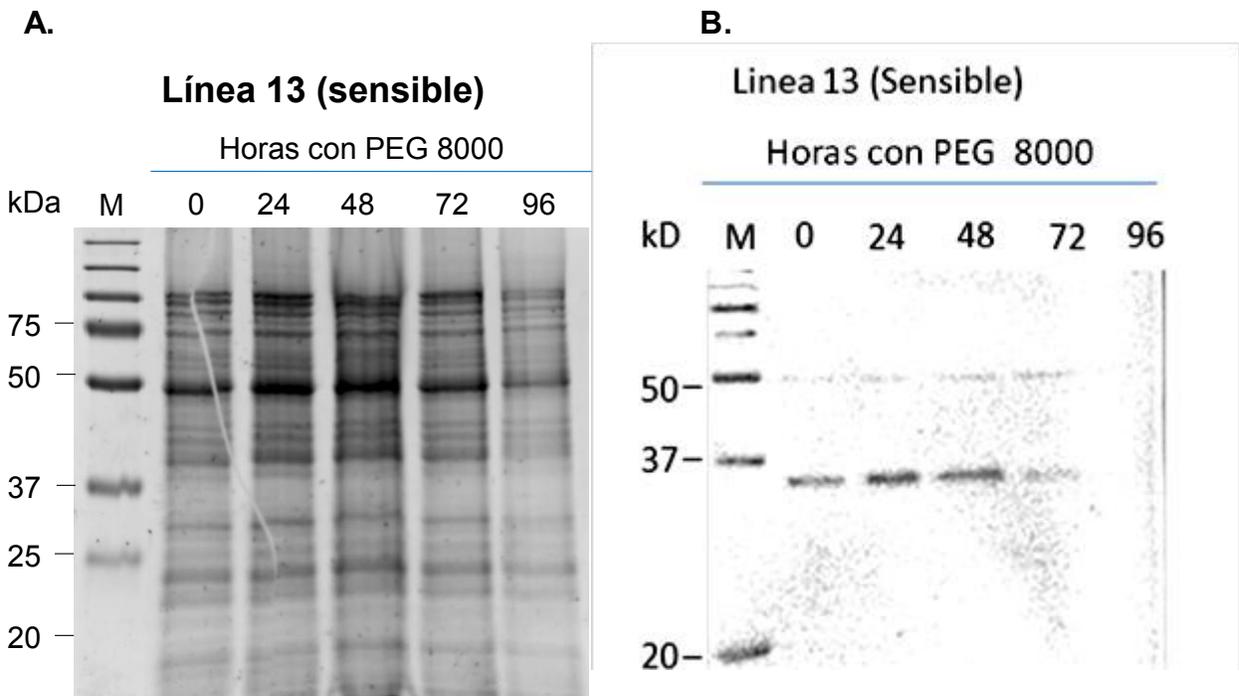


Figura 19. Identificación de dehidrinas en la parte aérea de plántulas de maíz de la línea sensible sometidas estrés por sequía. En el primer carril se observa el marcador molecular. Los siguientes carriles corresponden a las proteínas de las plántulas tratadas con PEG 8000 durante 0, 48, 72 y 96 horas. **A.** Gel teñido con azul de Coomassie. **B.** Western Blot usando el antisegmento-K para detectar a las dehidrinas. Se cargaron 50 µg de proteína total de parte aérea por carril.

En el WB realizado a las proteínas de la parte aérea de las plantas de maíz de la línea sensible se observan 2 bandas. Una de muy baja intensidad a 50 kDa y otra menor a 37 kDa. Estas bandas se mantienen constantes hasta las 48 h. Luego, decaen a las 72 h y finalmente, a las 96 h ya no son detectadas. La banda cercana a los 37 kDa no se había detectado ni en las plantas Tuxpeño ni en la línea tolerante.

Perfil global de dehidrinas en la raíz de las plantas de maíz

En este trabajo también se buscó la presencia de dehidrinas en la raíz de las plantas de maíz sometidas a estrés hídrico. A continuación se muestran las inmunodetecciones realizadas en la raíz de las plantas de maíz sometidas a estrés hídrico de la raza Tuxpeño, la línea tolerante y la línea sensible usando el anticuerpo anti-antisegmento-K.

En la figura 20 se presentan los geles de poliacrilamida-SDS con sus correspondientes WB para detectar a las dehidrinas de las plantas que fueron sometidas a estrés por sequía. Sin embargo, en ninguno de los WB se detectaron proteínas con el antisegmento-K en las muestras de raíz. Sólo se pueden observar las dos bandas inmunodetectadas por el antisegmento-K correspondientes al eje embrionario (control positivo). La primera banda se encuentra aproximadamente a 50 kDa y la segunda a 25 kDa.

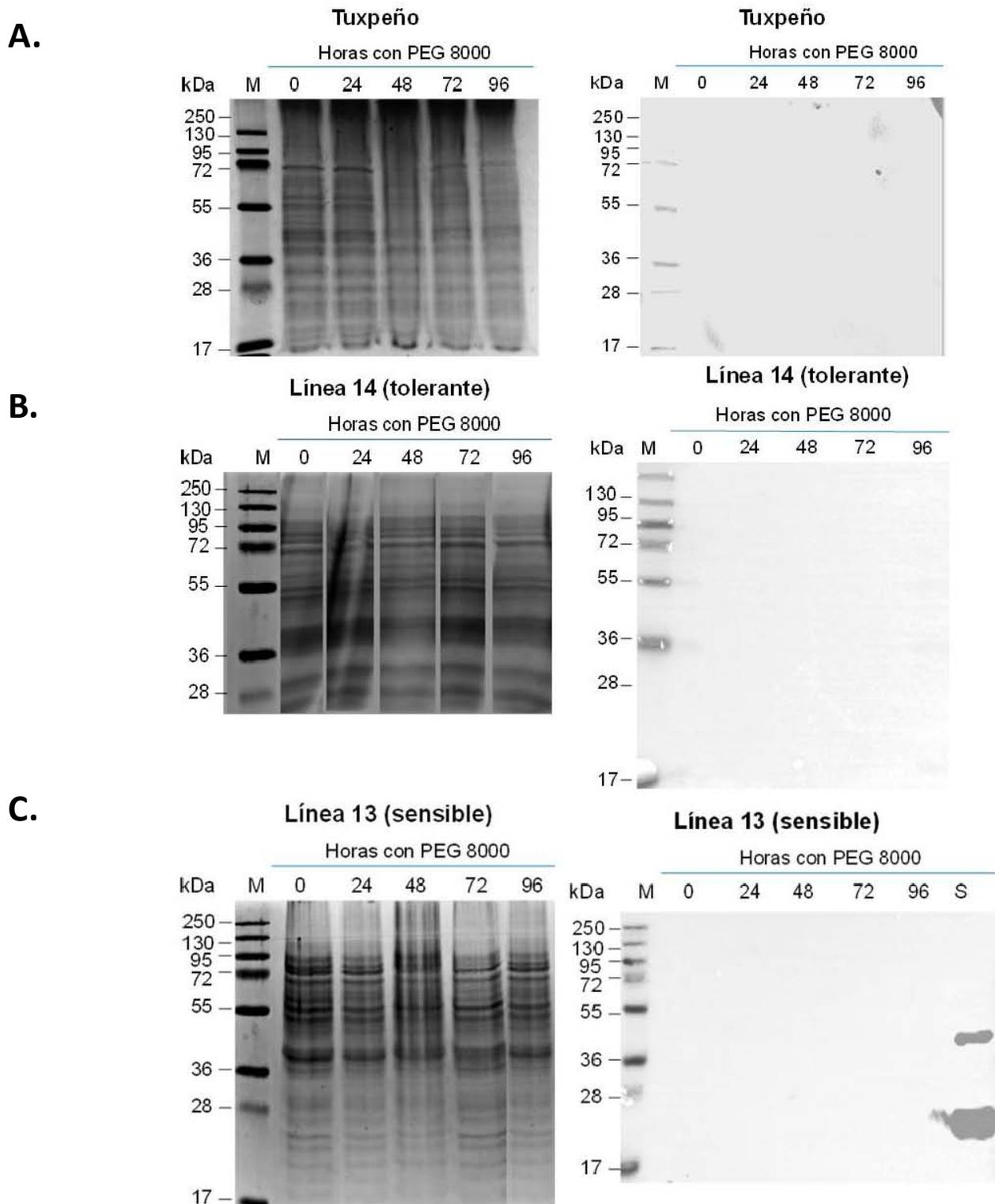
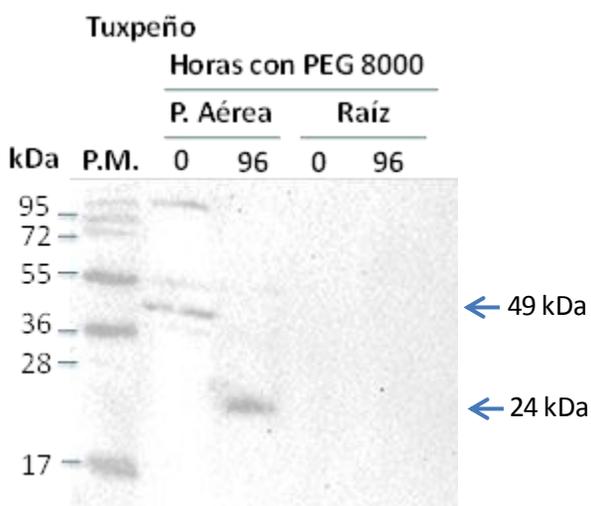


Figura 20. Perfil de dehidrinas de la raíz de plántulas de maíz sometidas estrés por sequía. En el primer carril está el marcador molecular (M). Los siguientes carriles corresponden a las proteínas de las plántulas estresadas con PEG 8000 durante 0, 24, 48, 72 y 96 h. **A.** Tuxpeño. **B.** Línea tolerante **C.** Línea sensible. En el panel izquierdo se presenta el gel teñido con azul de oomassie y en el derecho el WB

A.



B.

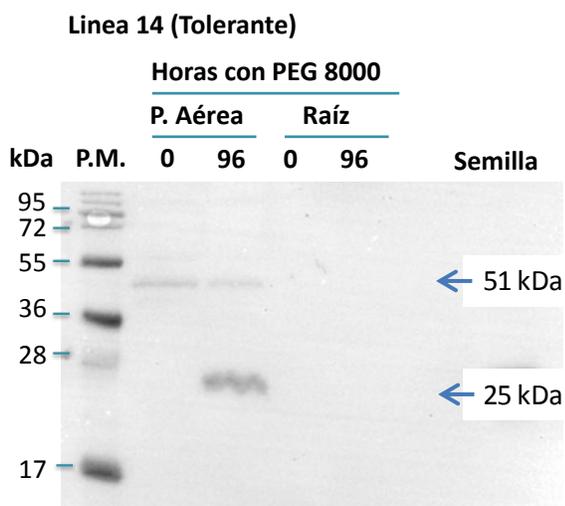


Figura 21. Detección del segmento K por Western Blot de las proteínas de la parte aérea y la raíz de plántulas de maíz de la raza Tuxpeño (A) y la línea tolerante sometidas estrés por sequía (B).

En la parte aérea de las plantas de maíz de la raza Tuxpeño a las 0 h (Fig 21A), están presentes dos bandas inmunodetectadas por el anticuerpo contra el segmento-K, la de 150 kDa es tenue y la segunda es de aproximadamente 50 kDa. Mientras que a las 96 h se observa sólo una banda, la de aproximadamente 25 kDa. En cuanto a la raíz, no se detectaron banda.

En la figura 21B se observan las inmunodetecciones del segmento K correspondientes al tejido de las plantas de la línea tolerante. En la parte aérea, a las 0 horas, se detectó una banda de aproximadamente 50 kDa, al igual que en la raza Tuxpeño. Mientras que a las 96 h se observan dos bandas: la de 50 kDa, que se mantiene y una de 25 kDa aproximadamente. En cuanto a la raíz, no se encontró alguna banda. Los pesos moleculares indicados con flechas son los calculados con el programa Image Lab.

Se envió a análisis la banda de 25 kDa por espectrometría de masas y se encontró (Tabla 1) que la línea tolerante (L14) y la raza Tuxpeño contenían a la misma proteína identificada como la proteína RAB17 de *Zea mays*, de acuerdo a la base de datos con la que cuenta el programa que analiza las secuencias.

Tabla 1. Proteínas identificadas por espectrometría de masas (EM)

MUESTRA	ACCESO	DESCRIPCIÓN	MW	PEPTIDOS	COBERTURA (%)
L14 (Tolerante)	A3KLI1_MAIZE	RAB17 protein OS Zea mays	17065	17	64.88
TUXPEÑO	A3KLI1_MAIZE	RAB17 protein OS Zea mays	17065	13	67.26

DISCUSIÓN

Las dehidrinas son proteínas que se acumulan en estructuras tolerantes a la desecación de las plantas como las semillas (Barker *et al.*, 1988; Dure *et al.*, 1989; Close *et al.*, 1993; 1997). En las figuras 11 a 13 de los resultados se encontraron dehidrinas, consideradas así porque contienen el segmento-K, dominio conservado de estas proteínas (Barker *et al.*, 1988; Dure *et al.*, 1989; Close *et al.*, 1993; 1997; Battaglia *et al.*, 2008). Además estas proteínas son consideradas IDPs, lo que les da la característica de ser termosolubles, es decir que aún con tratamientos térmicos permanecen solubles. De hecho, una forma de purificar IDPs es usando tratamientos térmicos (Dunker *et al.*, 2001; Tompa, 2002). En la figura 11 se aprecia como al usar este tratamiento (100°C, 10 min) se optimiza la extracción de dehidrinas del eje embrionario de las semillas de maíz quiescentes. Este mismo comportamiento se ha observado en otros trabajos de Amara con LEA de maíz (Amara *et al.*, 2011; 2013)

Otra forma de corroborar que las proteínas identificadas en la semilla de maíz son dehidrinas, es su reducción en el tejido al tener las condiciones adecuadas de hidratación, se observó que las dehidrinas en la semilla desaparecieron paulatinamente conforme avanzó el tiempo de imbibición. Esto se debe a que las dehidrinas se sintetizan durante el periodo de la desecación de la semilla y el denominado periodo de dormancia que les permite mantener su viabilidad un tiempo prolongado (Barker *et al.*, 1988; Dure *et al.*, 1989; Tunnacliffe *et al.*, 2010). Sin embargo, una vez que esta estructura vegetal percibe las condiciones óptimas para su germinación ya no necesita algunas proteínas, como es el caso de las dehidrinas.

Por otra parte, los genes que codifican para las dehidrinas son genes dependientes de ABA, cuyos promotores contienen una secuencia denominada ABRE (Zhu *et al.*, 2014), y que durante el estado quiescente de la semilla responde a la concentración alta de ABA sintetizando, entre otras moléculas, a las dehidrinas. Mientras que en el proceso de germinación disminuye la concentración de ABA y aumenta el nivel de otras hormonas que regulan el crecimiento celular como son las auxinas, giberelinas y citocininas (Abbe *et al.*, 1954; Barker *et al.*, 1988; Dure *et al.*, 1989; Ulmasov *et al.*, 1997; Bommerl *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2014). En el caso de las semillas estudiadas la síntesis de dehidrinas disminuye, hasta desaparecer aproximadamente a los 2 días de germinación, similar a otros trabajos (Vilardell *et al.*, 1990).

Con el propósito de comparar la masa molecular y la intensidad de las dehidrinas identificadas con el anticuerpo antisegmento-K en las diferentes semillas, se realizó la separación de las proteínas de ejes de embrionarios de la raza Tuxpeño (Tux), la línea tolerante (L.14) y la línea sensible (L.13). Se ha reportado en *Arabidopsis thaliana* y en *Solanum tuberosum* que las dehidrinas sintetizadas pueden variar dependiendo del tejido y las condiciones de estrés (Nylander et al., 2001; Gazanchien et al., 2006; Vaseva et al., 2009; Bassett et al., 2009; Liu et al. 2011; Charffedine et al., 2015), por lo que con en este ensayo se quería conocer si en maíz existían estas variaciones en las semillas. Ya que las líneas L14 y L13 pasaron por un proceso de selección para tolerar la sequía (Zarco-Perelló et al., 2005), podrían presentar un perfil global de dehidrinas diferente al de la raza Tuxpeño. Sin embargo, este no fue el caso, ya que las tres muestras evaluadas presentaron el mismo perfil de dehidrinas, número e intensidad

El polietilenglicol (PEG) ha servido para inducir estrés hídrico en la mayoría de los estudios realizados relacionados con el tema. El PEG es un polímero de alto peso molecular usado como un reductor inerte del potencial osmótico en el medio, ya que no es iónico, ni fitotóxico, además de que tampoco disminuye los nutrientes presentes en el suelo (Rao y FTZ, 2013).

Para confirmar la presencia y la acumulación de dehidrinas en las plantas de maíz en condiciones de estrés por sequía se usó PEG 8000 durante 96 h. Las respuestas fisiológicas a estrés osmótico varían dependiendo de la intensidad del estrés, entre algunas están: la disminución de fotosíntesis, el cierre de estomas, lo cual disminuye la pérdida de agua y el gasto de energía por transpiración, el enrollamiento y el marchitamiento de hojas, el alargamiento de raíces y la pérdida de turgencia (Amara *et al.*, 2013; Davik *et al.*, 2013). En condiciones normales no hubo diferencia significativa entre la apariencia de las plantas Tuxpeño y las líneas evaluadas. Pero a las 96 h de estrés hídrico, las diferencias son notables, ya que la línea tolerante prácticamente no presentó daños, sólo ligero enrollamiento de las hojas, mientras que la raza Tuxpeño presentó mayor enrollamiento de la hoja, pigmentos en el tallo y reducción en la coloración verde de la hoja que podría asociarse a pérdida de clorofila, estos daños también los presentó la línea sensible, aunque con mayor intensidad. Con estos resultados se observa que la forma en que responden las plantas de maíz Tuxpeño y las líneas 13 y 14, al estrés generado es diferente y esto probablemente sea debido a que su genotipo también es diferente.

Las plantas tolerantes a sequía son capaces de mantener el contenido de agua en sus tejidos, sobrevivir a la reducción del contenido de agua o recuperarse completamente después de volver a ser regadas (Gazanchian et al., 2007; Hu et al., 2009). Como se muestra en las figuras 15 y 22, este fenómeno es cuantificable, ya que aplicando el mismo estrés en cada una de las plantas Tuxpeño y las líneas evaluadas, la respuesta en cuanto a contenido de agua fue diferente. La línea tolerante y la raza Tuxpeño normal al final del estrés mantuvieron un CRA similar, mientras que la línea sensible disminuyó su contenido de agua un 50%. Demostrando que aunque ninguna de las plantas es capaz de mantener totalmente el contenido normal de agua en sus hojas, la línea tolerante y la raza Tuxpeño tienen la capacidad de mantener mayores cantidades de agua en sus tejidos a pesar del estrés al que fueron sometidas.

Estos resultados podrían relacionarse con las dehidrinas ya que la capacidad de mantener más agua en los tejidos han sido observados cuando se sobreexpresan las dehidrinas en *Arabidopsis thaliana*, *Solanum tuberosum* y *Musa sp.* sometido en condiciones de sequía (Brini et al., 2007; Shekhawat et al., 2011; Lui et al., 2015). Las dehidrinas se pueden unir a moléculas de agua, de tal forma que, disminuyen la pérdida de agua en plantas sometidas a sequía. Por lo cual, plantas sobreexpresantes de dehidrinas tienen mejor capacidad para retener agua (Brini et al., 2007; Shekhawat et al., 2011; Lui et al., 2015).

Lo anterior podría explicar la supervivencia de la línea tolerante, la sensible y la normal. La línea tolerante tuvo un 100 % de supervivencia y es capaz de recuperarse completamente después de volver a ser regada, lo que implica que la forma en que responde a estrés por sequía es más eficiente que la normal y la línea sensible (Kosova et al., 2007; Vaseva et al., 2009; Amara et al., 2012; 2013).

Al inicio de este trabajo solo se conocía que las líneas usadas en el presente estudio habían sido obtenidas por selección recurrente, luego se probaron en el campo y la línea tolerante había mantenido un buen rendimiento aun en condiciones de sequía, mientras que la sensible no (Zarco-Perelló et al., 2005). La raza Tuxpeño es considerada versátil, de climas cálidos y de buenos rendimientos, además su germoplasma ha sido usado para obtener mejores variedades (Conabio, 2011; Perales y Golicher, 2014). Sin embargo esta no ha pasado por un proceso de selección recurrente a sequía y por lo tanto en este trabajo es considerada normal.

En muchos estudios se ha observado una correlación positiva entre la acumulación de DHN y la tolerancia a estrés (Zhang *et al.*, 2000; Svensson *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2002; Kosova *et al.*, 2007; Brini *et al.*, 2007 y 2011; Hanin *et al.*, 2011; Amara *et al.*, 2011 y 2013; Liu *et al.*, 2015), como es este caso. Al analizar la presencia de dehidrinas por anticuerpos, se encontró que el perfil de la línea tolerante y la normal es similar, sin embargo, el de la línea sensible no lo es (Figura 18). La única dehidrina común en los tres casos es la de masa molecular de 50 kDa (Figuras 17, 18 y 19), aunque en Tuxpeño y en la línea tolerante a la sequía tienen un nivel de abundancia mayor, contrario a la línea sensible que se presenta muy tenue en intensidad. Las dehidrinas de alguna forma tienen diferentes funciones biológicas y se presentan en diferentes tejidos ante diversas condiciones de estrés y hormonas (Barker *et al.*, 1988; Dure *et al.*, 1989; Close, 1997; Zhu *et al.*, 2000; Nylander *et al.*, 2001). También existen dehidrinas que son constitutivas, es decir, dehidrinas que están presentes aún en condiciones favorables para el crecimiento de la planta (Nylander *et al.*, 2001; Rorat *et al.*, 2004 y 2006; Rorat, 2006; Burrieza *et al.*, 2012; Vaseva *et al.*, 2013). La dehidrina de 50 kDa es constitutiva, ya que aparece a las 0 h durante la etapa de desarrollo (V5) de estas plantas de maíz, donde no hay ningún estrés. En otros trabajos se ha visto que en condiciones de estrés las dehidrinas constitutivas disminuyen su concentración (Nylander *et al.*, 2001; Rorat *et al.*, 2004; 2006; Rorat, 2006; Wang *et al.*, 2014; Charffedine *et al.*, 2015). Este comportamiento concuerda en las dos líneas y la raza Tuxpeño, sin embargo en la línea tolerante disminuye su concentración lentamente ya que a las 96 h de estrés aún se encuentra presente a diferencia de las otras dos. Por lo que se puede considerar que aun siendo una dehidrina constitutiva, esta cumple su función de “dehidrina” protegiendo a las plantas de la línea tolerante y Tuxpeño ante el estrés al que fueron sometidas.

Otras dos dehidrinas encontradas en este estudio son: la de 150 kDa en la raza Tuxpeño y la de 37 kDa en la línea sensible. Ambas tienen un comportamiento similar al de la dehidrina de 50 kDa, por estar presente a las 0 h, no obstante, en ambas se observa que aumentan su concentración a las 24 h y luego, disminuyen hasta desaparecer al final del tratamiento. Este comportamiento podría indicar que estas proteínas participan en el inicio de las condiciones de estrés y que si este se prolonga ya no tienen la función de protección, esto lo sugerimos ya que al aumentar el tiempo de exposición al PEG que supondría un estrés sostenido, disminuye la intensidad estas bandas, la de 37 kDa en la línea sensible y la de 150 kDa en la raza Tuxpeño (Gazanchian *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2014). Se ha encontrado que la expresión

de dehidrinas depende del genotipo, el tipo de DHN y las condiciones de estrés (Liu 2011; Zhu 2013). Además, estas dehidrinas podrían tener una estructura parecida, aunque al momento no podríamos asegurarlo. Actualmente se ha intentado correlacionar las funciones de las dehidrinas con su comportamiento, lo que ayuda a su clasificación, sin embargo no se sabe con certeza qué tipo de estrés induce la expresión de dehidrinas específicas (Nylander et al 2001; Wise, 2003; Hundertmark y Hinch, 2008; Vaseva et al., 2010; 2011; 2014; Burrieza et al., 2012; Wang et al., 2014). Otro punto interesante, sobre estas dos dehidrinas presentes en las plantas, es que ninguna de las dos está presente en semilla. Como se mencionó con anterioridad, las dehidrinas se presentan en diferentes tejidos ante diversas condiciones de estrés y hormonas, es decir, las dehidrinas presentes en un tejido, pueden o no estar en todos los tejidos (Close, 1997; Zhu et al., 2000; Nylander et al 2001; Charfeddine et al., 2015).

La dehidrina de 25 kDa es muy interesante, ya que está presente en la línea tolerante y en la normal. Además se observa su acumulación conforme aumenta el estrés por sequía al que fueron sometidas las plantas de maíz. De acuerdo a Nylander, los tratamientos más largos siempre muestran la mayor acumulación de ciertas dehidrinas (Nylander et al., 2001). Las diferencias que presentan la línea 14 y la raza Tuxpeño de maíz evaluadas en relación con esta dehidrina es la acumulación, en la línea tolerante se observa una mayor acumulación que en la normal.

La correlación positiva entre la acumulación de DHN y la tolerancia a estrés no solo comprende la presencia de éstas, sino también a la de otros componentes que ayudan a la resistencia al estrés (Zhang *et al.*, 2000; Svensson *et al.*, 2002; Cheng *et al.*, 2002; Kosova *et al.*, 2007; Brini *et al.*, 2007; 2011; Hanin *et al.*, 2011; Amara *et al.*, 2011; 2013; Liu *et al.*, 2015). En este trabajo es claro que la línea tolerante presentó mayor tolerancia al estrés al que fue sometida en comparación con las otras dos, así como la correlación con la presencia de la dehidrina de 25 kDa de forma anticipada y en mayor concentración en la línea tolerante en comparación con la raza Tuxpeño. Además de que la presencia de la banda de 50 kDa podría considerarse constitutiva ya que está presente solo en las líneas que resisten el estrés hídrico impuesto por el PEG, la línea tolerante y la raza Tuxpeño.

Finalmente, en las raíces no se observaron dehidrinas presentes durante el estrés al que fueron sometidas las plantas. Esto se puede explicar de dos formas: el estrés generado no es

suficiente para que la planta sintetice dehidrinas en la raíz o la presencia de dehidrinas en la raíz está debajo del nivel de detección, como es el caso de un estudio de dos variedades de café donde observan diferentes dehidrinas en varios tejidos (Hinniger *et al.*, 2006; Álvarez *et al.*, 2012; Gomez-Bellot, 2013). No obstante, el hecho de que, durante el estrés al que fueron sometidas, las raíces de las plantas no tuvieron dehidrinas no significa que no presenten otras proteínas LEA que protejan esta estructura. En el 2014, se encontró la presencia de proteínas LEA 4 sólo en raíz de plantas maíz en condiciones de estrés con PEG 8000 (Zamora, 2013)

Para terminar, la proteína de masa molecular de 25 kDa de la línea tolerante y la raza Tuxpeño se analizó por espectrofotometría de masas y fue identificada como la RAB17, también conocida como DHN1. Algunas dehidrinas, las que presentan el segmento-S, como la RAB17, pueden estar fosforiladas, por un proceso postraduccional de señalización y localización (Villardel *et al.*, 1990; Plana *et al.*, 1991; Goday *et al.*, 1994; Jiang y Wang 2004). Las proteínas son generalmente fosforiladas para permanecer en el citoplasma (Jensen *et al.*, 1998; Vaseva *et al.*, 2009). En el caso de la dehidrina RAB17 su localización es regulada por fosforilación, cuando está fosforilada se encuentra en el citoplasma, mientras, que cuando no está fosforilada se encuentra en el núcleo (Riera *et al.*, 2004; Hara *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2013). En diferentes investigaciones donde se ha estudiado su presencia en el maíz, así como la de sus ortólogos, se observan entre 20 y 25 kDa aproximadamente en un gel SDS-PAGE, porque está fosforilada (Villardel *et al.*, 1990; Amara *et al.*, 2011; 2013), aunque su peso molecular sea de 17 kDa (Goday *et al.*, 1988; Villardel *et al.*, 1990; Amara *et al.*, 2011; 2013). Además se ha observado que las dehidrinas del grupo YSK2 de trigo, como es la clasificación de la RAB17, son las de mayor inducción en hojas deshidratadas (Wang *et al.* 2014), resultados similares fueron obtenidos en papa (Charffedine *et al.*, 2015).

La proteína RAB17 puede ser considerada de vital importancia ya que indica una clara diferencia entre los genotipos estudiados. Por dicho motivo se sugiere como una proteína para evaluar perfiles tolerantes a sequía en granos económicamente importantes, de una manera más rápida en comparación al método por selección recurrente. También se sugiere como marcador molecular para identificar tolerancia a sequía.

Conclusiones

Los tres genotipos de maíz estudiados sintetizaron dehidrinas en condiciones de estrés por sequía, sin embargo no tuvieron el mismo perfil. Se sugiere que el perfil global de dehidrinas inducidas por estrés hídrico se asocia a la tolerancia de sequía que presentan las semillas de cada una de las líneas evaluadas, ya que las dehidrinas identificadas varían en concentración, tendencia y tiempo en que están presentes.

La línea tolerante presentó ventajas contra la raza Tuxpeño y la línea sensible, al alcanzar una supervivencia del 100 % en las condiciones de estrés al que fue sometida. Además fue capaz de sintetizar una dehidrina en mayor concentración y forma anticipada en comparación con las plantas raza Tuxpeño y la línea sensible. Esta dehidrina fue identificada como la RAB17, por lo que claramente, una mayor concentración de dehidrinas específicas en las plantas de maíz durante condiciones de estrés hídrico puede conferirles la capacidad de supervivencia a condiciones de estrés.

Perspectivas

Este trabajo es la base para seguir estudiando esta proteína, se propone continuar con la obtención de plantas que sobreexpresen el gen RAB17/DHN1 en una raza sin selección recurrente, con el fin de conseguir líneas tolerantes a estrés hídrico.

O bien usar a RAB17 como marcador molecular para identificar genotipos de maíces tolerantes al estrés hídrico

Bibliografía

- Allagulova, CR, Gimalov, FR, Shakirova, FM, Vakhitov, VA (2003) The plant dehydrins: structure and putative functions. *Biochem. Mosc.* 68, 945-951
- Alsheikh MK, Heyen BJ, Randall SK (2003) Ion binding properties of the dehydrin ERD14 are dependent upon phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 278, 40882–40889
- Alsheikh MK, Svensson JT, Randall SK (2005) Phosphorylation regulates ion-binding is a property shared by the acidic subclass dehydrins. *Plant Cell Environ.* 28, 1114-1122
- Álvarez S, Gomez-Bellot MJ, Castillo M, Bañon S, Sánchez-Blanco MJ (2012) Osmotic and saline effect on growth, water relations, and ion uptake and translocation in *Phlomis purpurea* plants. *Environ. Exp. Bot.* 78, 138-145
- Amara I, Capellades M, Ludevid MD, Pagés M, Goday A (2013) Enhanced water stress tolerance of transgenic maize plants over-expressing LEA Rab28 gene. *J Plant Physiol.* 170, 864-873
- Amara I, Odena A, Oliveira E, Moreno A, Masmoudi K, Pagés M, Goday A (2012) Insights into maize LEA proteins: from proteomics to functional approaches. *Plant Cell Physiol.* 53(2), 312-329
- Anderson, E. y Cutler, H.C. (1942) Races of *Zea mays*. I. Their recognition and classification. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 29: 69-89.
- Ashraf M (1994) Breeding for salinity tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13, 17-42
- Baker JC, Steele C, Dure III L (1988) Sequence and characterization of 6 LEA proteins and their genes from cotton. *Plant Mol. Biol.* 11, 277-291
- Battaglia M, Olvera-Carrillo Y, Garcarrubio A, Campos F, Cavarrubias A (2008) The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins. *Plant Physiol.* 148, 6-24.
- Bellon MR, Hodson D, Hellin J (2011) Assessing the vulnerability of traditional maize seed systems in Mexico to climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 13432-13437
- Borowski GB, Stupnikova IV, Antipina AL, Vladimirova SV, Voinikov VK (2002) Accumulation of dehydrin-like proteins in the mitochondria of cereals in response to cold, freezing, drought and ABA treatment. *BMC Plant. Biol.* 2, 5
- Brini F, Hanin M, Lumberras V, Irar S, Pagés M, Masmoud K (2007) Functional characterization of DHN5, a dehydrin showing a differential phosphorylation pattern in

two Tunisian durum wheat varieties with marked differences in salt and drought tolerance. *Plant Sci.* 172, 248-254

Brini F, Saibi W, Amara I, Gargouri A, Masmoud K, Hanin M (2010) The wheat dehydrin DHN5 exerts a heat protective effect on β -glucosidase and glucose oxidase activities. *Biosci. Biotech. Biochem.* 74, 1050-1054

Brini, F, Yamamoto, A, Jlaiel, L, Takeda, S, Hobo, T, Dinh, HQ, Hattori, T, Masmoudi, K, Hanin, M (2011) Pleiotropic effects of the wheat dehydrin DHN-5 on stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 52, 676-688

Brown WL y Goodman MM (1977) Races of corn. En Sprague GF. *Corn and Corn Improvement*. Number 18 in the series *Agronomy*. American Society of Agronomy, Inc. Publisher, Madison, Wisconsin, USA pp. 49-88.

Buchanan CD, Lim SY, Salzman RA, Kagiampakis L, morishige DT, Weers BD, Klein RR, Pratt LH, Cordinnier-Pratt MM, Klein PE, Mullet JE (2005) *Sorghum bicolor*'s transcriptome response to dehydration, high salinity and ABA. *Plant Mol. Biol.* 58, 699-720

Burrieza HP, López-Frnández MP, Chiquieri TB, Silveira V (2012) Accumulation pattern of dehydrins during sugarcane somatic embryogenesis. *Plant Cell Rep.* 31, 2139-2149

Campbell SA, Close TJ (1997) Dehydrins: genes, proteins and associations with phenotypic traits. *New Phytol.* 137, 61-74.

Charffeddine S, Saïdi MN, Charffeddine M, Gargouri-Bouزيد R (2015) Genome-wide identification and expression profiling of the late embryogenesis abundant genes in potato with emphasis on dehydrins. *Mol. Biol. Rep.* DOI 10.1007/s1103-015-3853-2

Chen J, Lausser A, Dresselhaus T (2014) Hormonal responses during early embryogenesis in maize. *Biochem. Soc. Trans.* 42, 325-331

Cheng ZQ, Targolli J, Huang XQ, Wu R (2002) Wheat LEA genes, PMA80 and PMA 1959, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Breed* 10, 71-82.

Close TJ (1997) Dehydrins: a commonality in the response of plants to dehydration and low temperature. *Physiol Plant* 100, 291-296.

Close TJ, Fenton RD, Moonan F (1993) A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxy terminal peptide. *Plant Mol. Biol.* 23, 279-286

Close TJ, Kortt A, Chandler PM (1989) A cDNA-based comparison of dehydration-induced proteins (dehydrins) in barley and corn. *Plant Mol. Biol.* 13, 95-108

- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, 2012. [En línea]
(Actualizado) Disponible en:
<http://www.biodiversidad.gob.mx/usos/maices/razas2012.html>
- Danyluk J, Perron A, Houde M, Limin A, Fowler B, Benhamou N, Sarha F (1998) accumulation of an acidic dehydrin in the vicinity of the plasma membrane during cold acclimation of wheat. *Plant Cell* 10, 623-638
- Dowswell CD, Paliwal RL, Cantrell RP (1996) Maize in the third world. Winrock development-orientated literature studies. Boulder, Colorado: West Viewpress, 1996.
- Dira M, Saibi W, Amara I, Masmoudi K, Hanin M, Brini F (2015) Wheat dehydrin K-segments ensure bacterial stress tolerance, antiaggregation and antimicrobial effects. *Appl. Biochem. Biotech.* DOI 10.1007/s12010-015-1502-9
- Dira M, Saibi W, Brini F, Gargouri A, Masmoudi K, Hanin M (2013) The K-segments of the wheat dehydrin DHN5 are essential for the protection of lactate dehydrogenase and β -glucosidase activities in vitro. *Mol. Biotech.* 54, 643-650
- Dunker AK, Brown CJ, Lawson JD, Iakoucheva LM, Obradovic Z (2002) Intrinsic disorder and protein function. *Biochem.* 41, 6573-6582
- Dunker AK, Oldfield CJ, Meng JW, Romero P, Yang JY, Chen JW, Vacic V, Obradovic Z, Uversky VN (2008) The unfoldomics decade: An update of intrinsically disordered proteins. *BMC Genomics* 9, S1
- Dure L (1993) Structural motifs in LEA proteins In: Close TJ, Bray EA (eds) Plant responses to cellular dehydration during environmental stress. American Society of Plant Physiologists, Rockville, pp 91-103.
- Dure L, Crouch M, Haráda J, Ho THD, Mundy J, Quatrano RS, Thomas T, Sung ZR (1989) Common amino acid sequence domains among the LEA proteins of higher plants. *Plant Mol. Biol.* 12, 475-486
- Dyson HJ, Wright PE (2005) Intrinsically unstructured proteins and their functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 197-208
- Eberhart Steve, ARS-USDA, CIMMYT, Pioneer Hi-Bred International Inc., Universidad Agraria La Molina (1991) LAMP Proyecto Latinoamericano de Maíz, Perú.
- Egerton-Warburton LM, Balsamo RA, Close TJ (1997) Temporal accumulation and ultrastructural localization of dehydrins in *Zea mays* L. *Physiol. Plant.* 101, 545-555

- Eriksson SK, Kutzer M, Procek J, Gröbner G, Harryson P (2011) Tunable membrane binding of the intrinsically disordered dehydrin Lti30, a cold-induced plant stress protein. *Plant Cell* 23, 2391-2404
- Figueras M, Pujal J, Saleh A, Save R, Pages M, Goday A (2004) Maize Rab17 overexpression in *Arabidopsis* plants promotes osmotic stress tolerance. *Ann. Appl. Biol.* 144, 251-257
- Filiz E, Ozyigit II, Tombuloglu H, Koc I (2013) In silico comparative analysis of LEA proteins in *Brachypodium distachyon* L. *Plant Omics* 6, 433-440.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2010 [En línea] (Actualizado al Abril 2015): <http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s15.htm>
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, 2013. Base de datos estadísticas [En línea] (Actualizado al Abril 2015): <http://www.fao.org/docrep/003/x7650s/x7650s15.htm>
- Gallagher SR (2006) One-dimensional SDS gel electrophoresis of proteins. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 8, Unit 8.4.
- Garay-Arroyo A, Colmenero-Flores JM, Garciarrubio A, Covarrubias AA (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J. Biol. Chem.* 275, 5668-5674
- Gazanchian A, Hajheidari M, Sima NK, Salekdeh GH (2007) Proteome response of *Elymus elongatum* to severe water stress and recovery. *J. Exp. Bot.* 58, 291-300
- Goday A, Jensen AB, Culiñez-Maciá FA, Mar Albá M, Figueras M, Serratos J, Torrent M, Pagés M (1994) The maize abscisic acid-responsive protein Rab17 is located in the nucleus and interacts with nuclear localization signals. *Plant Cell* 6, 351-360
- Gómez-Bellot MJ, Álvarez S, Castillo M, Bañón S, Ortuño MF, Sánchez-Blanco MJ (2013) Water relations, nutrient content and developmental responses of *Euonymus* plants irrigated with water of different degrees of salinity and quality. *J. Plant Res.* 126, 567-576
- Goodman MM y McK Bird R (1977) The races of maize IV: tentative grouping of 219 Latin American races. *Econ. Bot.* 31, 204-221
- Goyal K, Walton LJ, Tunnacliffe A (2005) LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. *Biochem. J.* 151-157
- Hallauer AR (1992) Recurrent selection in maize. *Plant Breed. Rev.* 9, 115-179.

- Hallauer AR y Miranda JB (1981) Quantitative genetics in maize breeding, 1st ed. Ames, IA, USA, Iowa State University Press.
- Hallauer AR (1985) Compendium of recurrent selection methods and their application. Crit. Rev. Plant Sci. 3, 1-33
- Hanin M, Brini F, Ebel C, Toda Y, Takeda S, Masmoudi K (2011) Plant dehydrins and stress tolerance. Plant Signal Behav. 6, 1503-1509.
- Hara M, Fujinaga M, Kuboi T (2004) Radical scavenging activity and oxidative modification of citrus dehydrin. Plant Physiol. Biochem. 42, 657-662
- Hara M, Fujinaga M, Kuboi T (2005) Metal binding by citrus dehydrin with histidine-rich domains. J. Exp. Bot. 56, 2695-2703
- Hara M, Terashima S, Fukaya T, Kuboi T (2003) Enhancement of cold tolerance and inhibition of lipid peroxidation by citrus dehydrin in transgenic tobacco. Planta 217, 290-298.
- Hara M, Shinoda Y, Tanaka Y, Kuboi T (2009) DNA binding of citrus dehydrin promoted by zinc ion. Plant Cell Environ. 32, 532-541.
- Hayano-Kanashiro C, Calderón-Vázquez C, Ibarra-Laclette E, Herrera-Estrella L, Simpson J (2009) Analysis of gene expression and physiological responses in three Mexican maize landraces under drought stress and recovery irrigation. PloS One 4, e7531
- Hinniger C, Caillet V, Michoux F, Ben-Amor M, Tanksley S, Lin C, McCarthy J (2006) Isolation and characterization of cDNA encoding three dehydrins expressed during *Coffea canephora* (Robusta) grain development. Ann. Bot. 97, 755-65.
- Houde M, Daniel C, Lachapelle M, Allard F, Lalibert S, Sarhan F (1995) Immunolocalization of freezing-tolerance-associated proteins in the cytoplasm and nucleoplasm of wheat crown tissues. Plant J. 8, 583-593
- Hu L, Wang Z, Huang B (2009) Photosynthetic responses of Bermuda grass to drought stress associated with stomatal and metabolic limitations. Crop Sci. 49, 1902-1909
- Hughes S y Graether SP (2011) Cryoprotective mechanism of a small intrinsically disordered dehydrin protein. Protein Sci. 20, 42-50
- Hughes S, Scharf V, Malcolmson J, Hogarth KA, Martynowics DM, Tralman-Baker E, Patel SN, Graether S, (2013) The importance of size and disorder in the cryoprotective effects of dehydrins. Plant Physiol. 163, 1376-1386
- Hundertmark M y Hinch DK (2008) LEA (late embryogenesis abundant) proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. BMC Genomics 9, 118

- Hundertmark M, Dimova R, Legenfeld J, Seckler R, Hinch DK (2011) The intrinsically disordered LEA protein LEA18 from *Arabidopsis thaliana* modulates membrane stability through binding and folding. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 446-453
- Hundertmark M, Hinch DK (2008) The intrinsically disordered LEA proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9, 118
- Ismail AM, Hall AE, Close TJ (1999) purification and partial characterization of a dehydrin involved in chilling tolerance during seedling emergence of cowpea. *Plant Physiol.* 120, 237-244
- Jiang X y Wang Y(2004) B-elimination coupled with tandem mass spectrometry for the identification of in vivo and in vitro phosphorylation sites in maize dehydrin DHN1 protein. *Biochem.* 43, 15567-15576
- Koag MC, Wilkens S, Feton RD, Resnik J, Vo E, Close TJ (2009) The k-segment of maize DHN1 mediates binding to anionic phospholipid vesicles and concomitant structural changes. *Plant Physiol.* 150, 1503- 1514
- Kosová K, Vítámvás P, Prásil IT (2014) Wheat and barley dehydrins under cold, drought, and salinity - what can LEA-II proteins tell us about plant stress response? *Front. Plant Sci.* 5, 343
- Kovacs D, Kalmar E, Torok Z, Tompa P (2008) Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins. *Plant Physiol.* 147, 381-390
- Lan T, Gao J, Zeng QY (2013) Genome-wide analysis of the LEA protein gene family in *Populus trichocarpa*. *Tree Genet. Genomes* 9, 253-264.
- Leprince O y Buitink J (2010) Desiccation tolerance: from genomics to the field. *Plant Sci.* 179, 554-564
- Liu H, Yu C, Li H, Ouyang B, Wang T, Zhang J, Wang X, Ye Z (2015) Overexpression of ShDHN, a dehydrin gene from *Solanum habrochaites* enhances tolerance to multiple abiotic stresses in tomato. *Plant Sci.* 231, 198-211
- Liu L (2011) Expression analysis of dehydrin in 4 genotypes wheat under soil drought stress. Master thesis, Northwest A&F University
- Liu Y y Zheng Y (2005) PM2, a group 3 LEA protein from soybean and its 22-mer repeating region confer salt tolerance in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 311, 325-332

- Nylander M, Svensson J, Palva ET, Welin BV (2001) Stress-induced accumulation and tissue-specific localization of dehydrins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 45, 263-279
- Ortega P, Sánchez J, Castillo F, Hernández JM (1991) Estado actual de los estudios sobre maíces nativos de México. En Ortega P, Palomino G, Castillo F, González VA, Livera M. Avances en el estudio de los recursos fitogenéticos de México. Soc. Mex. de Fitogenética, A. C., Chapingo, México. pp. 161-185.
- Ortega-Paczka R (2003) La diversidad del maíz en México. En Esteva G y Marielle C. Sin Maíz no hay País. Consejo Nacional para la Cultura y las Artes, Dirección General de Culturas Populares e Indígenas, México, D. F. pp. 123-154.
- Ozturk ZN, Talame V, Deyholos M, Michalowski CB, Galbraith DW, Gozukirmizi N, Tuberosa R, Bohnert HJ (2002) Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought-and-salt-stressed barley. *Plant Mol. Biol.* 48, 551-573
- Perales H y Golicher D (2014) Mapping the diversity of maize races in Mexico. *PLoS One* e114657.
- Pieters PJ y Souki SE (2005) Effects of drought during grain filling on PSII activity in rice. *J. Plant Physiol.* 24, 123-131
- Plana M, Itarle E, Eritja R, Goday A, Pagés M, Martínez MC (1991) Phosphorylation of maize Rab17 protein by casein kinase. *J. Biol. Chem.* 33, 22510-22514
- Popova AV, Hundertmark M, Seckler R, Hincha DK (2011) Structural transitions in the intrinsically disordered plant dehydration stress protein LEA7 upon drying and modulates by the presence of membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 1808, 1879-1887
- Puhakainen T, Hess MW, Makela P, Svensson J, Heino P, Palva ET (2004) Overexpression of multiple dehydrin genes enhances tolerance to freezing stress in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 54, 743-753.
- Rahman LN, Chen L, Nazim S, Bamm VV, Yaish MW, Moffat BA, Dutcher JR, Harauz G (2010) Interactions of intrinsically disordered of *Thellungiella salsuginea* dehydrins TsDHN1 and TsDHN2 with membranes. *Biochem. Cell Biol.* 88, 791-807
- Rahman LN, Smith GST, Bamm VV, Voyer-Grant JAM, Moffat BA, Dutcher JR, Harauz G (2011) Phosphorylation of *Thellungiella salsuginea* dehydrins TsDHN1 and TsDHN2 facilitates cation-induced conformational changes and actin assembly. *Biochem.* 50, 9487-9604

- Rao S y FTZ J (2013) In vitro selection and characterization of polyethylene glycol (PEG) tolerant callus lines and regeneration of plantlets from the selected callus lines in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Physiol. Mol. Biol. Plant* 19, 261-268
- Reyes CP (1990) *El maíz y su cultivo*. AGT editor S.A. México, D.F.
- Ribaut JM y Ragot M (2007) Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives. *JExp Bot* 58, 351–360.
- Riera M, Figueras M, López C, Goday A, Pagés M (2004) Protein kinase CK2 modulates developmental functions of the ABA responsive protein Rab17 from maize. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 101, 9879-9884
- Ritchie SW, Hanway JJ y Benson GO (1992) How a corn plant develops. Iowa state university of science and technology. Cooperative extension service. Special Report 48
- Roberts LM, Grant UC, Ramírez R, Hatheway WH, Smith D, Mangelsdorf PC (1957) Races of maize in Colombia. National Academy of Sciences- National Research Council, Publication 510, Washington, D. C. pp. 1-153.
- Rorat T, Grygorowicz, WJ, Irzykowski W, Rey, P (2004) Expression of KS-type dehydrins is primarily regulated by factors related to organ type and leaf developmental stage under vegetative growth. *Planta* 218, 878-885
- Rorat T, Szabala, BM, Grygorowicz, WJ, Wojtowicz, B, Yin, Z, Rey, P (2006) Expression of SK3-type dehydrin in transporting organs is associated with cold acclimation in *Solanum* species. *Planta* 224, 205-221
- Rorat, T (2006) Plant dehydrins—tissue location, structure and function. *Cell Mol. Biol. Lett.* 11, 536-556
- Rosales R, Romero I, Escribano MI, Merodio C, Sanchez-Ballesta MT (2014) The crucial role of ϕ - and K-segments in the in vitro functionality of *Vitis vinifera* dehydrin DHN1a . *Phytochem.* 108, 17-25
- Roychoudhury A, Roy C, Sengupta DN (2007) Transgenic tobacco plants overexpressing the heterologous gene RAB16A from rice during high salt and water deficit display enhanced tolerance to salinity stress. *Plant Cell* 26, 1839-1859.
- Sánchez JJ, Goodman MM, Stuber CW (2000) Isozymatic and morphological diversity in the races of maize of México. *Ec. Bot.* 54, 43-59

- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquero, 2013. Base de datos estadísticos [En línea] (Actualizado al 23 de Septiembre de 2013): http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=214
- Shekhawat UKS, Srinivas L, Ganapathi TR (2011) MusaDHN-1, a novel multiple stress-inducible SK3-type dehydrin gene, contributes affirmatively to drought- and salt-stress tolerance in banana. *Planta* 234, 915–932
- Shih MD, Hsieh TY, Lin TP, Hsing YC, Hoekstra FA (2010) Characterization of two soybeans (*Glycine max* L.) LEA IV proteins by circular dichroism and Fourier transform infrared spectrometry. *Plant Cell Physiol.* 51, 395-407.
- Shulaev V, Cortes D, Miller G, Mittler R (2008) Metabolomics for plant stress response. *Physiol. Plant* 132, 199-208
- Sun X, Rikkerink E, Jones WT, Uversky VN (2013) Multifarious roles of intrinsic disordered in proteins illustrated its broad impact on plant biology. *Plant Cell* 25, 38-55
- Sun X, Xue B, Jones WT, Rikkerink E, Dunkere AK, Uversky VN (2011) A functionally required unfolded domain from the plant kingdom. *Plant Mol. Biol.* 77, 205-223
- Svensson J, Ismail A, Palva ET, Close TJ (2002) Dehydrins. En KB Storey and JB Storey eds, *Cell and Molecular Responses to Stress*. Elsevier Science, Amsterdam, The Netherlands, pp 155–171
- Tompa P (2002) Intrinsically unstructured proteins. *Trends Biochem. Sci.* 27, 527-533
- Tompa P y Kovács D (2010) Intrinsically disordered chaperones in plants and animals. *Biochem Cell. Biol.* 88, 167- 174
- Tompa P, Bánki P, Bokor M, Kamasa P, Kovács D, Lassandra G, Tompa K (2006) Protein-water and protein-buffer interaction aqueous solution of a intrinsically unstructured plant dehydrin. *Biophys. J.* 91, 2243-2249
- Tunnacliffe A y Wise MJ (2007) The continuing conundrum of the LEA proteins. *Naturwissenschaften* 94, 791-812
- Tunnacliffe A, Hinch D, Leprince O, Macherel D (2010) LEA proteins: Versatility of form and function. Dormancy and resistance in harsh environments. In E. Lubenz, J Cerda y M Clarks, eds (Berlin/Heidelberg: Springer), pp. 91-108
- Ulmasov T1, Murfett J, Hagen G, Guilfoyle TJ (1997) Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* 9, 1963-1971.

- Vaseva II, Grigorova BS, Somiva-Stoilova L, Demirevska K, Feller U (2010) ABA and LEA profile changes in winter wheat under progressive drought stress. *Plant Biol.* 12, 698-707
- Vaseva II, Akiscan I, Demirevska K, Anders I, Feller U (2011) Drought stress tolerance of red and white clover-comparative of some chaperonins and dehydrins. *Sci. Hort.* 130, 653-659
- Vaseva II, Anders I, Feller U (2014) Identification and expression of different dehydrin subclasses involved in the drought response of *Trifolium repens*. *J. Plant Physiol.* 171, 213-224
- Vigouroux Y, Glaubitz JC, Matsuoka Y, Goodman MM, Sánchez J, Doebley J (2008) Population structure and genetic diversity of new world maize races assessed by DNA microsatellites. *Amer. J. Bot.* 95, 1240-1253
- Vilardell J, Goday A, Freire MA, Torrent M, Martínez MA, Torné JM, Pagés M (1990) Gene sequence, development expression, and protein phosphorylation of RAB17 in maize. *Plant Mol. Biol.* 14, 423-432
- Vinocur B, y Altman A (2005) Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Current Opinion in Biotechnology* 16: 123–132
- Wang H, Miyazaki S, Kawai K, Deyholos M, Galbraith DW, Bohnert HJ (2003) Temporal progression of gene expression responses to salt shock un maize roots. *Plant Mol. Biol.* 52, 873-891
- Wang W, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9, 255-252
- Wang Y, Xu H, Zhu H, Tao Y, Zhang G, Zhang L, Zhang C, Zhang Z, Ma Z (2014) Classification and expression diversification of wheat dehydrin genes. *Plant Sci.* 214, 113-120.
- Weller M (1979) General aspects and functions of proteins which contain covalently bound phosphorous. In protein phosphorylation. Pion Ltd. London
- Wellhausen EJ, Roberts LM y Hernández X (1951) Razas de Maíz en México, su origen, características y distribución. Oficina de Estudios Especiales. Secretaría de Agricultura y Ganadería. México D. F.
- Wise MJ (2003) LEAping to conclusions: a computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatics* 4, 52

- Xu H, Yang Y, Xie L, Li X, Feng C, Chen J, Xu C (2014) Involvement of multiple types of dehydrins in the freezing response in loquat (*Eriobotrya japonica*). PLoS One DOI:10.1371/journal.pone.0087575
- Xue GP, McIntyre CL, Glassop D, Shorter R (2008) Use of expression analysis to dissect alterations in carbohydrate metabolism in wheat leaves during drought stress. Plant Mol. Biol. 67, 197-214
- Yang Y, He M, Zhu Z, Li S, Xu Y, Zhang C Singer SD, Wang Y (2012) Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress. BMC Plant Biol. 12, 140
- Yu JN, Zhang JS, Shan L, Chen SY (2005) two new group 3 LEA genes of wheat and their functional analysis in yeast. J. Int. Plant Biol. 47, 1372-1381
- Zamora JA (2013) Caracterización de una proteína LEA 4 de maíz en respuesta a estrés hídrico. Tesis de maestría, UNAM
- Zarco-Perelló E, González-Hernández VA, López-Peralta MC, Salinas-Moreno Y (2005) Marcadores fisiológicos de la tolerancia a sequía en maíz (*Zea mays* L.). Agrociencia 39, 517-528
- Zhang L, Ohta A, Takagi M, Imai R (2000) Expression of plant group 2 and group 3 LEA genes in *Saccharomyces cerevisiae* revealed functional divergence among LEA proteins. J. Biochem. 127, 611-616
- Zhou P, An Y, Wang Z, Du H, Huang B (2014) Characterization of Gene Expression Associated with Drought Avoidance and Tolerance Traits in a Perennial Grass Species. PloS One 9, e103611
- Zhu W, Zhang L, Lv H, Zhang H, Zhang D, Wang X, Chen J (2014) The dehydrin wyz2 promoter from wheat defines its contribution to stress tolerance. Func. Integr. Genomics 14, 111-125