



CIENCIA XUANL
ANIVERSARIO

Incremento de la tolerancia a sequía mediante la acumulación de trealosa por inhibición de RNAs en arroz (*Oryza sativa* L.)

DEYANIRA QUISTIAN MARTÍNEZ*, JOSÉ LUIS CABRERA PONCE**, JUAN JOSÉ PEÑA CABRIALES***, YOLANDA GUTIÉRREZ PUENTE****, ROBERTO MONTES DE OCA LUNA*

La resistencia a sequía es un fenómeno complejo que resulta de la interacción de las fisiológicas con factores ambientales. La resistencia al estrés abiótico es un carácter complejo, y la producción de plantas adaptadas involucra cambios genéticos y modificaciones fisiológicas importantes. El estrés de sequía en el arroz afecta prácticamente todos los caracteres del crecimiento y desarrollo de la planta, modificando la anatomía, morfología, fisiología y bioquímica.¹ Los principales tipos de estrés abiótico finalmente desencadenan en las plantas estrés osmótico, lo que ocasiona cambios adaptativos, como la acumulación de solutos orgánicos. El arroz sometido a alta salinidad acumula poliaminas² y prolina;³ otras plantas acumulan comúnmente azúcares,⁴ polioles⁵ y, como se ha visto, en casos menos comunes, trealosa.^{6,7}

La trealosa representa un molécula interesante, debido a sus funciones en la osmoprotección y tolerancia a la disecación.⁶⁻⁸ En arroz sometido a estrés salino, se ha observado que la presencia de trealosa presenta mayor capacidad de protección que la prolina en arroz.⁹

En el reino vegetal, la mayoría de las especies no acumulan cantidades considerables de trealosa, a excepción de las conocidas como *plantas de resurrección*, por ser altamente resistentes a la sequía. Por lo que en arroz, así como en otras plantas, se ha evalua-

do si la sobreproducción de este azúcar conduce al incremento de tolerancia a sequía y otros tipos de estrés.

Trabajos realizados en tabaco para la acumulación de trealosa¹⁰⁻¹² mostraron los aspectos negativos de la acumulación de intermediarios de la biosíntesis de trealosa, así como la degradación mediante la actividad hidrolítica de la enzima trealasa, por lo que la acumulación del azúcar no fue posible. A pesar de lo anterior, se obtuvieron resultados positivos de adquisición de diferentes niveles de tolerancia a estrés por sequía, salinidad y bajas temperaturas; a la par que se ha descubierto el importante papel de la trealosa-6-fosfato T6P como molécula de señalización en el metabolismo de carbohidratos en plantas, lo que condujo a una mejora en la capacidad fotosintética de la planta.¹³

En este trabajo se presentan los resultados de la inhibición por RNAs de la enzima trealasa, demostrando que tal inhibición incrementa los niveles de

* Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina.

** Departamento de Ingeniería Genética, CINVESTAV-Unidad Irapuato.

*** Departamento de Bioquímica, CINVESTAV-Unidad Irapuato.

**** Universidad Autónoma de Nuevo León, FCB.

quistian05@hotmail.com

trealosa y modifica el metabolismo de azúcares en plantas de arroz sometidas a estrés hídrico. La acumulación de trealosa en raíces de plantas sometidas a sequía mostró una mejora en la actividad fotosintética y mayor contenido relativo de agua bajo estas condiciones, que aquellas plantas sin inhibición en la producción de la enzima trealasa.

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

Material vegetal y DNA

Los experimentos se realizaron en la variedad mexicana, sensible a sequía, Morelos A98. Las semillas fueron proporcionadas por el INIFAP Unidad Zacatepec. El vector de expresión de RNAs constó de un fragmento de 560 pb, en versión antisentido (TREas), proveniente de alfalfa correspondiente a una región conservada entre los genes de trealasa de soya (*Glycine max*), papa (*Solanum tuberosum*), *Arabidopsis* y alfalfa (*Medicago sativa*). La expresión del antisentido está regulada por el promotor constitutivo 35S del Virus del Mosaico de la Coliflor (CaMV).

Obtención de cultivo embriogénico de arroz y regeneración de plantas

Semillas de arroz fueron esterilizadas superficialmente y colocadas para la inducción de callo embriogénico en medio MS suplementado con 3% de sacarosa, 2.5 mg L⁻¹ 2,4-D, e incubadas en oscuridad a 25°C, durante 15 días. El callo resultante se utilizó en los experimentos de transformación. La regeneración de plántulas se realizó en medio MS suplementado con 5 mg L⁻¹ de cinetina y 1% de sacarosa, bajo un fotoperiodo de 16 hrs luz/8 hrs oscuridad, hasta la germinación de embriones. La inducción de raíces se logró en MS suplementado con 8% de sacarosa. Las plantas obtenidas se sembraron en sustrato de

mezcla estándar en bolsa plástica de 10 L. La plantas se cultivaron en invernadero en condiciones de alta humedad (>85% HR) y un fotoperiodo de 16 hrs/8 hrs de oscuridad. Las plantas se fertilizaron con Ferviafol® 200 ppm hasta el final del experimento.

Transformación genética de arroz

La transformación de callos embriogénicos de arroz se realizó por el método de biobalística, con el sistema de bombardeo de DuPont Helium PDS-1000/He. Se utilizaron micropartículas de oro o tungsteno; el bombardeo se realizó bajo una presión de 800 PSI y 20-22 pulg. de Hg. Para la selección de tejido transformado, se cobombardó el vector pWRG1515, el cual contiene al gen reportero *uidA* y el gen *hptII* de resistencia a higromicina. La selección de callo transformado se realizó en presencia de 80 mg L⁻¹ de higromicina.

Caracterización de plantas transgénicas

Para la determinación de la presencia del transgén, se realizó una prueba de PCR. La reacción de PCR se realizó en un volumen de 50 ml, con los oligonucleótidos: TRE1:TATTACTGGGATTCT T y TRE2:TTGATTTAAATGCATTTCTACCCGGG; con el programa de amplificación: 1) 94°C-5 min, 2) 94°C-1 min, 3) 53°C-2 min, 4) 72°C-1 min, 5) 35 ciclos del paso 2 al 4, 6) 72°C-5 min. Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en gel de agarosa a 1%.

Actividad trealasa

La actividad enzimática se midió en plantas de 15 días, en condiciones *in vitro* en tejidos de hoja, tallo y raíz. La cuantificación de la glucosa liberada por la enzima presente en el extracto crudo se realizó con el

método enzimático colorimétrico de oxidasa-peroxidasa (kit GOD-POD) (SIGMA). La extracción de proteínas totales se realizó en buffer MES (ácido 2-[N-Morfolino] etansulfónico) 0.1 M pH 7, las proteínas se precipitaron en sulfato de amonio y se mantuvieron en buffer MES hasta realización de los ensayos enzimáticos. La actividad trealasa fue expresada como microgramos de glucosa liberada por miligramo de proteína por hora.

Tratamiento de sequía

El tratamiento de sequía se realizó en plantas de arroz de 50-60 días en invernadero. Para el grupo bajo estrés se suspendió el riego, y el grupo control permaneció con suministro de agua constante. Periódicamente, después de iniciado el tratamiento de sequía, el contenido relativo de humedad del suelo fue determinado por el método gravimérico. El tratamiento se extendió hasta que el contenido de agua del suelo alcanzó 20% (25-30 días posterior a la suspensión de riego). Antes de coleccionar las muestras, se determinó el contenido relativo de agua (CRA) en hoja.

Determinación de actividad fotosintética y parámetros fotosintéticos

La fotosíntesis, la resistencia y la conductancia estomática se midieron con un sistema portátil infrarrojo Li-Cor 6200 (LI-COR Inc. Lincoln, NE), utilizando hojas maduras y activas fotosintéticamente. Se utilizó una cámara de 200 cc. Las plantas fueron previamente climatizadas 20 min, bajo una intensidad de luz de 1,000 W.

Extracción y derivatización de carbohidratos

Las muestras coleccionadas fueron congeladas en nitrógeno líquido y posteriormente liofilizadas. Las raíces

secas fueron finamente molidas, tomando 100 mgr para su extracción etanol a 80%, y se incubaron a 90°C por 30 min. El material insoluble fue removido por centrifugación y extraído nuevamente. Los extractos fueron evaporados y finalmente resuspendidos en etanol a 80%. La derivatización de los carbohidratos, para obtener formas aldonitril peracetiladas de los azúcares, se realizó por la adición de piridoxina y cloruro de hidroxilamina, utilizando perseitol como estándar interno. Las muestras derivatizadas fueron finalmente reconstituidas en cloroformo para su análisis.

Identificación de carbohidratos por GC-MC

La identificación de azúcares solubles se realizó en un cromatógrafo de gases (HP 6850), acoplado a un selector de masas (HP 5973), equipado con una columna (Hewlett-Packard), se usó helio como gas acarreador (1mL min⁻¹). Las condiciones de operación fueron: temperatura de inyector y detector-300°C, temperatura inicial-150°C por 3 min (elevación de 6°C x min a 270°C, mantenido por 15 minutos). El cromatograma se analizó con el software GC/MSD ChemStation (Agilent Technologies) y los carbohidratos se identificaron con el espectro de masas de cada componente en NIST/EPA/NIH Mass Spectra Library (ver 2.0).

RESULTADOS

Inducción de callo embriogénico y transformación genética

A partir de embriones maduros, se generó el callo embriogénico, el cual se observó como una estructura globular amarillenta de consistencia firme, compuesta principalmente de embriones en etapa globular. Después de un periodo de 15 días, el callo fue

disectado de la semilla y transformado por el método de biobalística. Luego, la selección de tejido transformado se distinguió por su consistencia y crecimiento activo en presencia de higromicina. La respuesta morfogénica en el proceso de regeneración se observó con la germinación de embriones, con desarrollo del área foliar y elongación de la radícula simultáneamente.

Detección del transgén en plantas transformadas

Las plantas se analizaron con la técnica de PCR para corroborar la presencia del fragmento antisentido de trealasa. En líneas transgénicas, se obtuvo un fragmento de amplificación de 350 pb, correspondiente a una región interna de la secuencia utilizada como antisentido. La obtención de bandas de amplificación indica la naturaleza transgénica de las plantas analizadas.

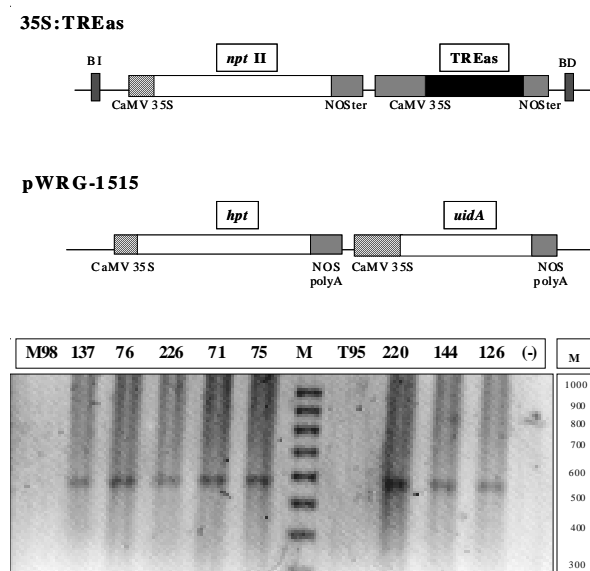


Fig. 1. Esquema de casete de expresión de RNA antisentido y plásmido de selección: a) 35S: TREas: vector de expresión de RNAs dirigido a la trealasa. b) pWRG-1515: vector con genes reporteros y de selección en higromicina. M98: Morelos A98 tipo silvestre; M, marcador de peso molecular 100 pbs Biotech; (-), control negativo de reacción.

Actividad enzimática de líneas transgénicas

En hoja, las líneas transgénicas mostraron disminución significativa de actividad trealasa en un rango de 100 a 59% (línea 137 y 76), dos permanecieron sin variación significativa (226 y 75) y una mostró un incremento de 150%, con respecto a plantas tipo silvestre. Los porcentajes de disminución de actividad en tallo se encontraron en un rango de 19 a 67% para todas las líneas. En raíces no se detectó actividad trealasa en las líneas transgénicas, a excepción de las líneas 71 y 75, en las que se determinó una actividad con valores cercanos a 0.02 mgr de Glu mgr Prot⁻¹ hr⁻¹ (figura 2).

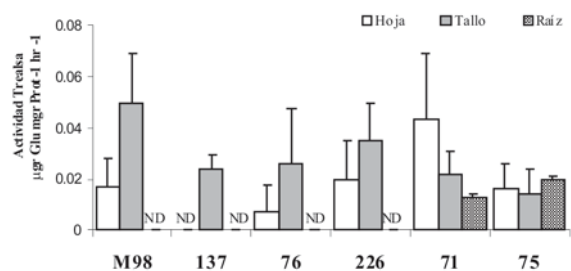


Fig. 2. Actividad trealasa en plantas transgénicas. Niveles de actividad trealasa en mgr de Glu mgr Prot⁻¹ hr⁻¹ en hoja, tallo y raíz de plantas control y transgénicas mantenidas bajo condiciones de cultivo *in vitro*; ND no detectada.

Acumulación de trealosa

Los niveles de trealosa en plantas silvestres en condiciones control corresponden a los 0.32 mgr gr⁻¹ PS, y hay una acumulación de 0.5 mgr gr⁻¹ PS en condiciones de estrés. En líneas transgénicas, bajo condiciones de riego, el contenido de trealosa fluctuó entre los 0.12 a los 0.49 mgr gr⁻¹ de PS. En condiciones de sequía, las líneas 137, 76 y 226 alcanzaron concentraciones apenas superiores a los 0.3 mgr gr⁻¹ PS; sin embargo, en las líneas 71 y 75 la acumulación de trealosa (~0.8 mgr gr⁻¹ PS) mostró diferen-

cias significativas, cuando se compararon con plantas silvestres. El incremento correspondió a 80% más acumulación de trealosa que en plantas no transformadas, y más de 100% de incremento con respecto a las condiciones control (figura 3).

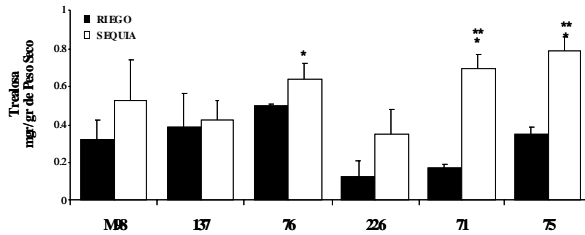


Fig. 3. Nivel de trealosa en raíces de plantas transgénicas. *Dif. sig., con respecto a planta Morelos A98 en las mismas condiciones; **Dif. sig., con respecto a las condiciones de riego.

Morfología de plantas transgénicas

De las líneas generadas, las 76 y 226 mostraron un mejor desarrollo que las plantas silvestres; puesto que mostraron mayor altura (figura 4). La arquitectura de la raíz no se modificó mayormente; sin embargo, se registró un incremento en el peso seco de raíz. Durante la aplicación del tratamiento de sequía se observó un incremento en la longitud de la raíz en general de 3-6 cm, sin ganancia en biomasa. El análisis de la producción de biomasa foliar y de raíz en condiciones de sequía en plantas silvestres y líneas transgénicas no reveló diferencias significativas con respecto a las condiciones de riego. Sin embargo, un aspecto importante es que todas las plantas sometidas a sequía se mantuvieron en etapa vegetativa, retrasando el inicio de la etapa reproductiva (figura 4).

Tolerancia a sequía en líneas transgénicas

El grado de tolerancia a sequía en las líneas transgénicas se determinó según el nivel de enrollamiento de la hoja y el CRA de hoja. El tratamiento de se-

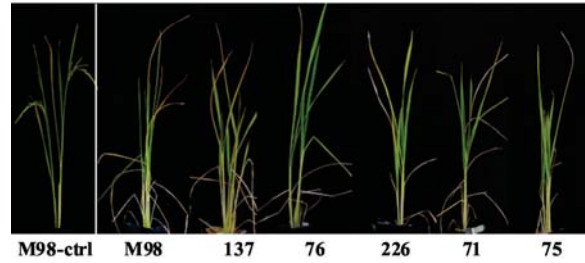


Fig. 4. Características morfológicas de plantas transgénicas sometidas a sequía: a) aspecto general de plantas control Morelos A98 y líneas transgénicas sometidas a tratamiento de sequía. Morelos A98-w.t, planta control en condiciones de crecimiento normal; M98, planta control en estrés.

quía provocó un enrollamiento total de todas sus hojas (nivel 4). Las líneas transgénicas presentaron un enrollamiento moderado (nivel 2-3). En condiciones de estrés, las plantas silvestres presentaron 50% de CRA en hoja, en tanto que las líneas transgénicas retuvieron el agua en sus hojas con mayor eficiencia, las líneas 76 y 75 mostraron significativamente mayor CRA (~85%). Las líneas 226 y 71 también fueron afectadas en el contenido de CRA bajo condiciones de sequía, pero sin mostrar enrollamiento de hoja (figura 5).

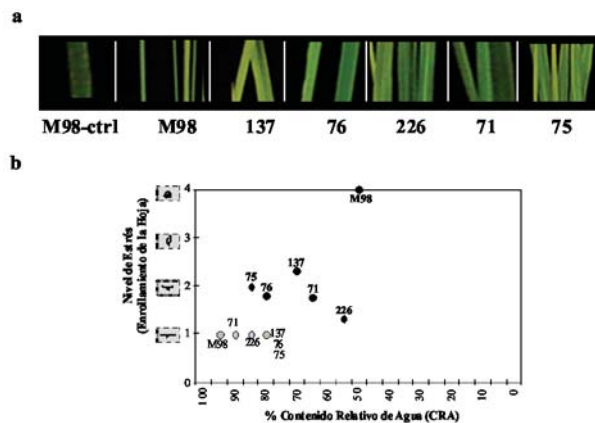


Fig. 5. Análisis de tolerancia a sequía en líneas transgénicas: a) detalle del fenotipo (enrollamiento de hoja) en plantas sometidas a sequía. M98-w.t., planta silvestre en condiciones de riego; M98, planta silvestre en condiciones de sequía; b) relación del porcentaje de CRA de hoja y el nivel de estrés desarrollado al final del tratamiento de sequía. % riego, % sequía.

Parámetros fotosintéticos en plantas transgénicas

La fotosíntesis neta, conductancia y resistencia estomática se midieron al final del tratamiento de sequía. En condiciones de riego, las líneas transgénicas presentaron igual o mayor actividad fotosintética que las plantas silvestres ($\sim 5 \text{ mmol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$) (figura 5). El tratamiento de sequía en plantas silvestres provocó una disminución del nivel fotosintético, en tanto las líneas transgénicas mantuvieron su nivel fotosintético, todas con una alta diferencia significativa en condiciones de estrés. En condiciones de riego, las plantas, control y líneas transgénicas mostraron niveles de conductancia estomática, fluctuando entre 0.2 y $0.4 \text{ mmol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$. Las condiciones de sequía afectaron significativamente la conductancia estomática en plantas silvestres y las líneas 71 y 75. La resistencia estomática, en condiciones de riego, mostró niveles de entre 2 y 5 s cm^{-1} similar para todas las plantas, a excepción de la línea 137, con valor cercano a los 6 s cm^{-1} , significativamente mayor a la planta control silvestre. Como se esperaba, las condiciones de sequía provocaron un aumento en la resistencia estomática de la hoja en plantas silvestres, respondiendo en forma similar para las líneas transgénicas (figura 6).

DISCUSIÓN

En gramíneas, se ha reportado que la actividad trealasa es ligeramente mayor en plantas tolerantes a salinidad y sequía, y que ésta disminuye bajo un tratamiento de sequía solamente en raíz de plantas tolerantes y no en plantas sensibles.¹⁴ En líneas transgénicas de arroz, el porcentaje de inhibición por RNAs obtenido en hoja y tallo fue discreto. En raíz, de las líneas 75 y 76, la actividad trealasa se relaciona directamente con el contenido de trealosa. En resumen, el patrón de actividad trealasa en líneas

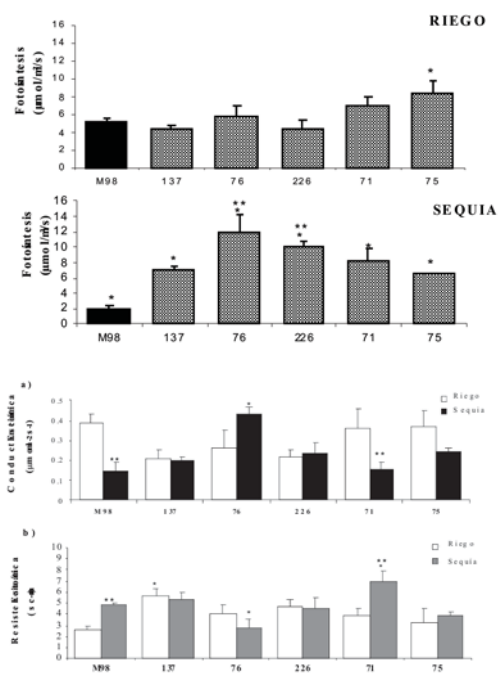


Fig. 6. Fotosíntesis neta, conductancia y resistencia estomática de líneas transgénicas. *Dif. sig., con respecto a planta silvestre; **Dif. sig., con respecto a las condiciones de riego.

transgénicas conserva significativa actividad en la raíz, las cuales se relacionan positivamente con el contenido de trealosa y tolerancia a estrés.

Es posible que este patrón de actividad trealasa sea positivo en la adquisición de tolerancia a estrés, como sucede en trigo,¹⁴ y que haya un mecanismo de regulación específico, responsable de este comportamiento. Cuando se analizó el contenido de trealosa en líneas transgénicas, no mostró una acumulación en condiciones control; sin embargo, la aplicación del estrés hídrico afectó positivamente en el mantenimiento de concentración o indujo en algunos casos mayor acumulación de trealosa en raíz de las plantas bajo estrés. Anteriormente, se ha observado que en plantas con modificaciones en la biosíntesis de trealosa, la trealosa no se acumula significativamente a pesar de el incremento en la actividad de genes biosintéticos.^{15,16}

En este punto, la raíz aparece como un órgano importante en la tolerancia a estrés, mediada por el metabolismo de trealosa. En trigo, se observó que cuando existe un estrés hídrico se induce la producción de trealosa en la raíz indicada por la actividad de la enzima TPS, y a su vez ocurre una represión de la actividad trealasa en la raíz en variedades tolerantes a estrés abiótico.¹⁴ Por lo tanto, la capacidad de regular el metabolismo de la trealosa para llevar a cabo su acumulación es probable que sea un importante mecanismo de adaptación en el que la actividad trealasa juegue un papel fundamental.

La producción de trealosa en plantas transgénicas presenta en algunos casos retraso del crecimiento y una alteración en el fenotipo de la hoja.^{8,11} Se ha comprobado que tales desviaciones son causadas por una sobreproducción de T6P.^{16,17} La estrategia propuesta en este trabajo consiste en la acumulación de trealosa sin la afectación de los niveles de T6P, por lo que se esperaban plantas sin efectos negativos sobre su crecimiento y desarrollo.

La inhibición de trealasa resultó en líneas transgénicas de arroz con características morfológicas similares a las plantas control. Se sabe que plantas acumuladoras de trealosa aumentan su tolerancia a estrés abiótico,^{8,11,15} sin embargo, no se ha reportado que la inhibición de trealasa incremente la tolerancia a estrés hídrico. El efecto observado en la planta control bajo el tratamiento de sequía en líneas transgénicas fue una mayor resistencia a estrés, observado por la disminución de nivel de enrollamiento de hoja; las hojas de la planta control sufrieron enrollamiento total (nivel 4) con un 50% de CRA (figura 5). Todas las líneas transgénicas mostraron un menor nivel de estrés (ubicados entre el 2 y 3) y mayor contenido de CRA que el control (figura 5).

La tolerancia a la sequía en las especies de cultivo está asociada al grado en que éstas regulan el conte-

nido de agua durante el estrés. Se demostró que el grado de enrollamiento de la hoja indica la capacidad del arroz de entrar en ajuste osmótico, y ocurre un retardo en la respuesta de enrollamiento de hoja en condiciones de bajo potencial de agua, esto permite mantener el intercambio de gaseosas, manteniendo la fotosíntesis de la misma manera que retarda la senescencia.¹⁸

Asimismo, se demostró que es posible la modificación de la fotosíntesis a través del metabolismo de trealosa.¹³ En las líneas transgénicas, los mayores niveles de acumulación de trealosa en condiciones de estrés mostraron una mejora en la capacidad fotosintética en condiciones control, y la sequía no afectó su actividad (figura 6); es posible que la trealosa acumulada en la raíz haya proporcionado la capacidad de retención de agua, evitando los daños provocados por la sequía. En las líneas que no presentaron acumulación significativa de trealosa, también se observó un incremento significativo en la capacidad fotosintética.

En líneas transgénicas se obtuvieron mayores niveles de conductancia estomática que en las plantas control. El mantenimiento de la conductancia estomática en condiciones de sequía de las líneas transgénicas mantiene la capacidad fotosintética y no limita la fotosíntesis, como ocurre en las plantas control. Es posible que este comportamiento se explique por un mayor número de estomas y la regulación de éstas bajo estrés hídrico. Las plantas transgénicas productoras de trealosa contienen de 20 a 30% más que las plantas silvestres, por lo que el cierre estomático no limita la fotosíntesis en condiciones de sequía,¹⁶ y es posible que el metabolismo de trealosa esté fuertemente implicado en la función estomática.¹⁹ Este aspecto se sumaría a las diversas funciones que el metabolismo de trealosa desarrolla en respuesta al estrés abiótico.

RESUMEN

La sequía es el principal factor limitante para el incremento de la productividad agrícola mundial, y el mejoramiento de variedades resistentes a sequía es una necesidad latente. Estudios del metabolismo de la trealosa han puesto en evidencia la capacidad generalizada de las plantas de sintetizarla y el importante papel que tiene en la resistencia a estrés hídrico. Este trabajo parte de la hipótesis de que la inhibición por RNA antisentido del gen de la trealasa incrementa los niveles de trealosa y confiere tolerancia al estrés abiótico. Inicialmente, se obtuvo un cultivo de callo embriogénico de arroz para su transformación por el método de biobalística con vectores de expresión de RNA antisentido dirigidos a la trealasa. En las líneas de arroz obtenidas, los niveles de trealosa alcanzados fueron de 780 mgr/gr PS como valor máximo. Esta acumulación de trealosa condujo a un incremento significativo en la capacidad fotosintética de las líneas transgénicas en condiciones de riego que aumenta en condiciones de sequía. De esta manera, fue posible concluir que la inhibición de la trealasa conduce a un incremento de trealosa en condiciones de sequía. La tolerancia de la planta a las condiciones de estrés se ve incrementada manteniendo altos nivel de fotosíntesis.

Palabras clave: Trealosa, Trealasa, Capacidad fotosintética, Sequía, Arroz.

ABSTRACT

Drought is the main limiting factor for increasing global agricultural productivity, and improvement of drought resistant varieties is a latent need. Studies of the metabolism of trehalose have revealed the widespread ability of plants to synthesize and the important role it plays in the resistance to water stress.

This paper begins with the hypothesis that antisense RNA inhibition of gene trehalase increased levels of trehalose and confers tolerance to abiotic stress. Initially obtained embryogenic callus culture of rice for processing by the biolistic method with expression vectors for antisense RNA targeting to the trehalase. In the rice lines obtained, trehalose levels were achieved at 780 mg/g PS maximum value. This accumulation of trehalose led to a significant increase in photosynthetic capacity of transgenic lines under irrigation and increase in drought conditions. Therefore it was possible to conclude that the inhibition of trehalase leads to an increase of trehalose in drought conditions and that plant tolerance to stress conditions is increased while maintaining high level of photosynthesis.

Keywords: Trehalose, Trehalase, Photosynthetic Capacity, Drought, Rice.

REFERENCIAS

1. Datta S.K. Seshu D.V. 1982. Evaluating rices for drought tolerance using field screening and multilocation testing. In: Drought resistance in crops with emphasis on rice. IRRI. Los Baños, Philippines. 324. Pp. 245-263.
2. Krishnamurthy R., Bahagwat K.A. 1989. Polyamines as modulators of SALT tolerance in rice cultivars. Plant Physiol 91: 500-504.
3. Chou I.T., Chen C.T., Kao C.H. 1991. Characteristics of the induction of proline accumulations by abscisic acid and isobutyric acid in detached rice leaves. Plant Cell Physiol. 32: 269-272.
4. Price J., Laxmi A., Martin S.K., Jang J.C. 2004. Global transcription profiling reveals multiple sugar signal transduction mechanisms in Arabidopsis; Plant Cell 16 2128-2150.
5. Loescher W.H., Tyson R.H., Everard J.D., Redgwell R.J., Bielecki RL 1992. Mannitol synthesis in higher plants. Evidence for the role and characterization of a NADPH-

- dependent mannose-6-phosphate reductase. *Plant Physiol* 98: 1396-1402.
6. Anselmino O., Gilgo E. 1993. Über das Vorkommen von Trehalose in Selaginella lepidophylla. *Ber Deut Pharm Ges.* 23: 326-330.
 7. Drennan P.M., Smith P., Goldsworthy D., van Staden J. 1993. The occurrence of Trehalose in the leaves of the desiccation-tolerant angiosperm *Myrothamnus febellifolius* Welw. *J. Plant Physiol.* 142:493- 496.
 8. Goddijn O., Dun K.V. 1997. Trehalose metabolism in plants, *TIPS.* 4 (8) 315-319.
 9. García A.B., de Almeida E.J., Iyer S., Gerats T., van Montagu M., Caplan A.B. 1997. Effects of osmoprotectants upon NaCl stress in rice. *Plant Physiol* 115: 159- 319.
 10. Holmstrom K.O., Mantyla E., Welin B., Mandal A., Palva E.T. 1996. Drought tolerance in tobacco. *Nature.* 379: 683-684.
 11. Pilon-Smits E.A.H., Terry N., Sears T., Kim H., Zayed A., Hwang S., van Dun K., Verwoerd ThC., Krutwagen R.W.H.H., Goddijn O.J.M. 1998. Trehalose-producing transgenic tobacco plants show improved growth performance under drought stress. *J. Plant. Physiol.* 152: 525-532.
 12. Yeo E.T., Kwon H.B., Han S.E., Lee J.T., Ryu J.C., Byu MO. 2000. Genetic engineering of drought resistant potato plants by introduction of the trehalose-6-phosphate synthase (TPS1) gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cells.* 10(3):263-268.
 13. Pellny T.K., Ghannoum O., Conroy J.P., Schlupepmann H., Smeekens S., Andralojc J., Krause K.P., Goddijn O., Paul M.J. 2004. Genetic modification of photosynthesis with *E. coli* genes for trehalose synthesis. *Plant Biotechnology J* 2: 71-82.
 14. El-Bashiti T., Hamamci H., Öktem H.A., Yücel M. 2005. Biochemical analysis of trehalose and its metabolizing enzymes in wheat under abiotic stress conditions. *Plant Science.* 169, 47 -54.
 15. Garg A.K., Kim J.K., Owens Th.G., Ranwala A.P., Choi Y.D., Kochian L.V., Wu R.J. 2002. Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc Nat Acad Sci.* 99 (25): 15898-15903.
 16. Karim S., Aronsson H., Ericson H., Pirhonen M., Leyman B., Welin B., Mantyla E., Palva T., Van Dijck P., Holmström K.O. 2007. Improved drought tolerance without undesired side effects in transgenic plants producing trehalosa. *Plant Mol Biol.* 64:371-386
 17. Schlupepmann H., van Dijken A., Aghdasi M., Paul M., Smeekens S. 2004. Trehalose mediated growth inhibition of *Arabidopsis* seedlings is due to trehalose-6-phosphate accumulation. *Plant Physiol* 135: 879-890.
 18. Hsiao T.C., O'Toole J.C., Yambao E.B., Turner N.C. 1984. Influence of Osmotic Adjustment on Leaf Rolling and Tissue Death in Rice (*Oryza sativa* L.) *Plant Physiol* 75, 338-341.
 19. Leonhardt N., Kwat J.M., Robert N., Waner D., Leonhardt G., Schroeder J.I. 2004. Microarray expression analyses of *arabidopsis* guard cells and isolation of recessive abscisic acid hypersensitive protein phosphatase 2C mutant. *Plant Cell.* 16:596-615.

Recibido: 1 de octubre de 2011

Aceptado: 25 de enero de 2012